

Aus dem Institut für Tierphysiologie der Universität München
(Vorstand: Prof. DDr. DDr. h.c. Johannes Brüggemann)
Arbeit unter Anleitung von Univ. Doz. Dr. H. Erbersdobler

Zur enzymatischen Freisetzung von Aminosäuren aus hitzegeschädigten Proteinen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär - medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von
Dore Ozdy
aus Hamburg

München 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554601_0047

Aus dem Institut für Tierphysiologie der Universität München
(Vorstand: Prof. DDr. DDr. h. c. Johannes Brüggemann)
Arbeit unter Anleitung von Univ. Doz. Dr. H. Erbersdobler

Zur enzymatischen Freisetzung von Aminosäuren aus hitzegeschädigten Proteinen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär - medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

von

Dore Ozdy

aus Hamburg

München 1973

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme
Referent: Univ. Doz. Dr. H. Erbersdobler
Korreferent: Prof. Dr. Dr.h.c. L. Kotter

Tag der Promotion: 27. Juli 1973

Meinem Vater

UNIVERSITY OF LEIDEN
LIBRARY

UNIV. OF LEIDEN
LIBRARY
UNIV. OF LEIDEN
LIBRARY

UNIV. OF LEIDEN
LIBRARY



Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Besprechung der Literatur	
2.1 Natur und Wirkung der Proteasen	2
2.2 Die Proteasen Pepsin, Papain und Pronase	3
2.3 Methoden zur Proteinbewertung	6
2.4 Fraktionierung von Peptiden nach dem Prinzip der Gelfiltration	8
3. Eigene Untersuchungen	
3.1 Untersuchungsmaterial	10
3.2 Untersuchungsmethoden	13
3.2.1 Prinzip des enzymatischen "Verdaulichkeitstests"	13
3.2.2 Hydrolyse mit den verschiedenen Enzymen	14
3.2.2.1 Hydrolyse mit Pepsin-Salzsäure	17
3.2.2.2 Hydrolyse mit Pronase	17
3.2.2.3 Hydrolyse mit Pepsin plus Papain	18
3.2.2.4 Bestimmung der Konzentration enzymatisch freigesetzter Aminosäuren	19
3.2.3 Gelfiltration mit Sephadex	20
3.2.4 Protein- und Aminosäureanalysen	21
3.2.5 Fehlerbreite des Analysenverfahrens	23
3.3 Ergebnisse	26
3.3.1 Hitzebehandeltes Sojaprotein und hitzebehandelte Modellgemische aus Sojaprotein mit Sojaöl	26
3.3.2 Hitzebehandlung (Autoklavierung) von Casein allein bzw. in Gegenwart von Glukose	32
3.3.3 Hitzebehandlung von Casein (110°C) bzw. von Modellgemischen aus Casein mit 10 % (90°C) und 20 % (105°C) Glukose	33
3.3.4 Gelfiltration mit Sephadex G-25	41
4. Diskussion und Schlußfolgerungen	45
4.1 Untersuchungsmethoden	45
4.2 Ergebnisse	48
5. Zusammenfassung, Summary	52
6. Literaturverzeichnis	55
Lebenslauf	

1. Einleitung

Die Ermittlung der Proteinqualität eines Nahrungs- und Futtermittels spielt aus ernährungsphysiologischen und wirtschaftlichen Gründen für die moderne Tierhaltung eine bedeutende Rolle. Aufschluß über die Proteinqualität geben chemische Analysen bzw. entsprechende in vitro Testmethoden sowie geeignete Tierversuche. Zu den wesentlichsten chemischen Methoden gehören die Aminosäurenanalyse, die heute hauptsächlich nach dem Ionenaustauschverfahren durchgeführt wird, und die sogenannte Bestimmung des verfügbaren Lysins nach der Dinitrofluorbenzol-Methode. Im biologischen Versuch wird die Proteinqualität über Bilanzverfahren bzw. im Zusammenhang mit dem Wachstum oder über verschiedene Körper- und Organfunktionen nachgewiesen. Der biologische Versuch ist jedoch oft recht umständlich und für Routineuntersuchungen häufig zu aufwendig. Es wird daher immer wieder versucht, durch die Entwicklung geeigneter in vitro-Verfahren den biologischen Versuch wenigstens teilweise ersetzen zu können.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Brauchbarkeit derartiger Tests am Beispiel von drei proteolytischen Enzymen - Pepsin, Pronase und Papain - überprüft werden. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob die entsprechenden enzymatischen Hydrolyseverfahren für den Nachweis der Aminosäurenverfügbarkeit geeignet sind. Die Untersuchungen wurden an unterschiedlich hitzebehandelten Proteinen durchgeführt, die bereits nach anderen chemischen und biologischen Kriterien untersucht worden waren. Es war daher ein Vergleich der verschiedenen Testverfahren möglich.

2. Besprechung der Literatur

2.1 Natur und Wirkung der Proteasen

In jeder lebenden Zelle sind proteolytische Enzyme nachweisbar. Bei höheren Tieren, bei manchen Pflanzen und auch bei Mikroorganismen gibt es Zellbestandteile oder Organe, in denen Proteasen gebildet werden, die spezielle Aufgaben, wie z. B. die Verdauung von Proteinen, erfüllen. Die meisten Proteasen sind auf bestimmte Strukturmerkmale spezialisiert; sie zerlegen Peptidketten hydrolytisch nach folgendem Schema:



Die meisten Proteasen sind in ihrer biologischen Funktion Verdauungsenzyme. Sie finden sich vorzugsweise extrazellulär im Magen-Darm-Trakt. Die in Zellen vorkommenden Proteasen werden den Kathepsinen zugeordnet. Man unterscheidet Proteinasen und Peptidasen. Die Peptidasen spalten nur Peptide. Sie greifen die Peptidketten von den Enden her an und werden auch Exopeptidasen genannt (6, 7, 8, 9). Die Proteinasen wirken auf Proteine und Polypeptide. Sie hydrolysieren besonders die Bindungen in der Mitte von Peptidketten und heißen daher auch Endopeptidasen. Viele bekannte Verdauungsenzyme, wie etwa Pepsin, Trypsin und z. B. das pflanzliche Enzym Papain, gehören dieser Einteilung nach zu den Proteinasen bzw. Endopeptidasen. Seit man gefunden hat, daß bestimmte niedermolekulare Peptide auch durch Proteinasen spaltbar sind und manche Hydrolysen beiden Gruppen zugeordnet werden müssen (9, 63), wird die Einteilung in Proteinasen und Peptidasen bzw. in Endo- und Exopeptidasen nur noch der Systematik wegen aufrechterhalten.

Die bekanntesten Proteasen pflanzlichen Ursprungs sind Papain, Ficin, Bromelain und Chymopapain. Sie ähneln sich hinsichtlich ihres Wirkungsmechanismus und werden durch Sulfhydrylgruppen und Cyanid aktiviert, durch Oxidationsmittel dagegen inaktiviert. Sie zeigen außerdem in und beim aktiven Zentrum eine weitgehende Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz. Es wird daher für möglich gehalten, daß sie alle von einer ge-

meinsamen Vorstufe abstammen. Nicht alle Pflanzenproteasen sind jedoch Sulfhydrylproteasen. Die Enzyme Solanin (29), Hurain (39) und Arachain (38) z. B. werden weder durch Sulfhydrylreagentien oder Cyanid aktiviert oder durch Oxidationsmittel inaktiviert. Über ihren Aktionsmechanismus ist bisher nur wenig bekannt.

Zu den bekanntesten Proteasen aus Einzellern gehören die Subtilisine (aus *Bacillus subtilis*) (48), eine Protease aus Streptokokkenkulturen (79), die Kollagenasen (z. B. in Clostridien) (73) und das Clostripain (aus *Clostridium histolyticum*) (55). Außerdem sind noch weitere Proteasengruppen bekannt, die aber bisher nur teilweise erforscht wurden. Die bei den vorliegenden Untersuchungen verwendete Pronase (aus *Streptomyces griseus*) (49) läßt sich in eine Gruppe von Metall-Endopeptidasen einordnen, die im neutralen Bereich besonders aktiv sind.

2.2 Die Proteasen Pepsin, Papain und Pronase

Enzyme vom Pepsintyp, die schon 1836 von SCHWANN ausführlich beschrieben wurden (72), finden sich im Magen sämtlicher Wirbeltiere. Sie werden von den Hauptzellen der Fundusdrüsen als die inaktive Vorstufe "Pepsinogen" sezerniert und wandeln sich bei pH-Werten unter 4,6 autokatalytisch in das vollwirksame Enzym "Pepsin" um. LANGLEY (45) stellte 1882 im schwach alkalischen Extrakt von Magenmukose einen katalytisch inaktiven Stoff (Pepsinogen) fest, der sich nach Säurezusatz in Pepsin umwandelte. Die Kristallisation von Pepsin führte als erster NORTHROP durch (64), die von Pepsinogen HERRIOTT (32). Damit begannen zahlreiche weitere Arbeiten über Pepsin als Protein und als Enzym (z. B. 17, 65, 69). Bereits NORTHROP war die Inhomogenität des kristallinen Enzyms aufgefallen (65). RYLE und PORTER beschrieben 1959 zwei weitere Proteasen aus Schweinemukosa (Pepsin B und C) mit ihren entsprechenden Vorstufen (70). 1967 wurde eine weitere Protease entdeckt (Pepsin D) (47). Die aktivste Form wurde Pepsin A genannt.

Pepsin hat seine optimale Wirkung bei stark saurer Reaktion (pH 1,5-2,5). Das pH-Optimum hängt jedoch auch von der Art des Substrates ab. Das Molekulargewicht von Pepsin liegt bei 35 000, während das Pepsinogen ein Molekulargewicht von 40 000 aufweist. Bei der Umwandlung in das aktive Enzym - entweder autokatalytisch bei saurer Reaktion oder durch Einwirken von Pepsin - kommt es durch Abspalten von Peptidresten zu einem Verlust von etwa 1/5 des Gesamtstickstoffs. Es wird dabei unter anderem ein Bruchstück mit dem Molekulargewicht von etwa 3000 bis 5000 abgespalten (86), das unter bestimmten

Umständen als Hemmkörper für das Pepsin wirksam werden kann.

Die Prüfung der Pepsinaktivität wird gewöhnlich mit der Methode nach ANSON (3) durchgeführt. Dabei wird säuredenaturisiertes Hämoglobin bei pH 1.8 und einer Temperatur von 37°C als Substrat benutzt. Die Freisetzung der in 3%iger Trichloressigsäure löslichen Spaltprodukte wird durch spektrophotometrische Messung bei 280 nm festgestellt. Eine Pepsinaktivitätseinheit ist als die Menge Enzym definiert, die ein Anwachsen der Absorption von 0.001/min hervorruft. Die Handelspräparate enthalten etwa 2500 - 3000 E/mg.

Pepsin spaltet im Gegensatz zu anderen Proteasen keine Ester, sondern nur Peptidbindungen. Es besitzt eine breite Seitenspezifität (35), wobei Peptidbindungen an Aminosäuren mit einer hydrophoben Seitenkette wie bei Phenylalanin, Tyrosin, Leucin und Methionin (78) bevorzugt werden.

Papain ist das erste Enzym, bei dem eine freie Sulfhydrylgruppe als essentiell für die katalytische Aktivität festgestellt wurde (12). Es wird aus dem Saft und den Früchten des Melonenbaumes (*Carica papaya*) gewonnen (37). Dieser Baum wird in fast allen tropischen Ländern angebaut.

Als proteolytisches Enzym wurde Papain zuerst von WURTZ und BOUCHUT 1879 (83) und später von WURTZ (84, 85) untersucht. Methoden zur Reingewinnung von Papain aus dem frischen Saft des Baumes und die Isolierung in kristalliner Form haben BALLS et al. 1937 bis 1939 beschrieben (4, 5). Bei der heute verwendeten Isolierungsmethode (40, 41) wird der getrocknete Saft verarbeitet. Papain hat ein Molekulargewicht von etwa 20 500. Es ist ein einfaches Protein, das nur Aminosäuren und keine Kohlenhydrate enthält (56). Die vorhandene (mindestens eine) Sulfhydrylgruppe wird mit der proteolytischen Aktivität in Zusammenhang gebracht (25). Papain ist gegenüber Temperatureinwirkung und geringen pH-Veränderungen im neutralen Bereich sehr stabil (Bei Erhitzung auf 75°C nur 5 % Aktivitätsverlust) (37, 42).

Als erster zeigte VINES 1901, daß Papain durch Cyanid aktiviert werden kann (87 - 90). BERSIN (11) und BERSIN und LOGEMANN (10) fanden, daß alle bekannten Aktivatoren von Papain Disulfidbindungen reduzieren können, während Oxidationsmittel wie Wasserstoffperoxid Papain inaktivieren. KIMMEL und SMITH (41) stellten fest, daß zur vollständigen Aktivierung nicht nur die Anwesenheit eines reduzierenden Agens benötigt wird, sondern daß auch Substanzen vorhanden sein sollten, die metallische Verunreinigungen binden. Die Empfindlichkeit des aktiven Papains gegenüber Schwermetallionen liegt in der starken Affinität der Sulfhydrylgruppen für solche Ionen begründet. Die höchste Enzymaktivität wurde bei Anwesenheit von Cystein und Äthylendiamintetraacetat (EDTA) gefunden, die Metallionen besonders gut binden können. Diese Ergebnisse bestätigten die Theorie von KREBS (43, 44) aus den Jahren 1930/31, daß das

Entfernen von Schwermetallen für die maximale Aktivierung von Papain notwendig ist. Sie zeigen aber auch, daß Reduktionsmittel benötigt werden - vermutlich für die Reduktion von Disulfidbindungen zu freien Thiolgruppen - die für die Aktivität damit essentiell sind. Der Aktivator ist jedoch nur für den Start der Reaktion notwendig (42).

Mit Papain gelang als erster Proteinase die Hydrolyse von synthetischen Peptidsubstraten (81). Daran knüpfte sich ein intensives Studium der Spezifität des Papains. Die entscheidende Darstellung des weiten hydrolytischen Spektrums von Papain auf Proteine zeigte CALVERY (16). Er bewies, daß Papain eine ausgedehntere Spezifität besitzt als etwa Trypsin oder Pepsin. 1955 bestätigten SANGER, THOMPSON und KITAI (71) dieses Ergebnis. Papain hydrolysiert besonders die Amide von α -aminosubstituiertem Arginin, Lysin, Glutaminsäure, Histidin, Glycin und Tyrosin (75). Papain greift außerdem an sehr vielen anderen Bindungen an. Das pH-Optimum für die Proteolyse hängt vorwiegend vom Substrat ab. Es liegt z. B. bei der Hydrolyse von Gelatine und Casein bei pH 5 (28, 36), bei Fibrin jedoch im Bereich von pH 7 (82). Außer der hydrolytischen Aktivität besitzt Papain noch eine starke Esteraseaktivität (40, 36).

Pronase wurde als Nebenprodukt bei der Streptomycinherstellung aus *Streptomyces griseus* 1958 von NOMOTO und NARAHASHI entdeckt und beschrieben (58). Das Enzym wurde "*Streptomyces* Protease G" genannt.

Die Abtrennung von Streptomycin gelang zunächst durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat. Da das Aussalzen mit Ammoniumsulfat bei der Trennung der Protease von Streptomycin für die Weiterbehandlung der Streptomycinfraktion auf Schwierigkeiten stieß, werden heute das Streptomycin und die Protease nach dem Molekularsiebeffekt getrennt (59). Nach dieser Reinigung und Acetonpräzipitation kristallisiert es in Nadelform aus (61). Es handelt sich um ein homogenes Präparat wie sich mit Ultrazentrifuge-, Elektrophorese- und mit enzymatischen Untersuchungen beweisen ließ (60). Das kristalline Enzym hat ein Molekulargewicht von etwa 20 000, der isoelektrische Punkt liegt bei pH 5.0- 5.5, das pH-Optimum der Enzymaktivität bei pH 8.0- 9.0. Das Enzym ist im pH-Bereich von 6.0- 9.0 und bei Temperaturen bis 60°C recht stabil (61). Außerdem stabilisieren Calcium-Ionen und die Anwesenheit von Substratmolekülen die Protease. Pronase hydrolysiert fast alle Proteine, nur Skleroproteine werden kaum angegriffen.

Fast alle übrigen Proteasen haben eine genau festgelegte Substratspezifität, d. h. sie hydrolysieren nur solche Peptidbindungen, die der besonderen Bindungseigenschaft (Affinität) jeder Protease entsprechen (18). Soweit bekannt ist, beschränkt sich der Umfang der Hydrolyse dabei auf 10 - 30 % der Peptidbindungen, so daß als Verdauungsprodukte Poly- und Oligopeptide übrigbleiben. Pronase dagegen besitzt eine weite Substratspezifität. Sie kann verschiedenartige Peptidbindungen bis hinab zu den freien Aminosäuren hydrolysieren. Der Umfang der Hydrolyse durch Pronase wird auf 60 - 90 % geschätzt. Eine derartig starke proteolytische Aktivität ist bis dahin bei keiner anderen Protease festgestellt worden (62).

Pronase kann somit nicht in die Bergmannsche Klassifikation von Endo- und Exopeptidasen eingeordnet werden, da sie die Peptidketten sowohl von den Enden her als auch in der Mitte spaltet (63). Man führt diese Eigenschaft auf eine besondere Konfiguration der aktiven Gruppe des Enzyms zurück, die offenbar wenige sterische Hindernisse zur Formation der Enzym-substratkombination aufweist (63).

2.3 Methoden zur Proteinbewertung

Der potentielle Nährwert eines Proteins ergibt sich aus dem Vergleich des nach vollständiger Hydrolyse ermittelten Aminosäuregehaltes mit entsprechenden Werten von Standardproteinen bekannter Qualität oder mit den Bedarfsnormen der landwirtschaftlichen Nutztiere bzw. des Menschen. Methoden dieser Art sind z. B. der "chemical score" (13), bei dem die sogenannte erste limitierende Aminosäure bestimmt wird, und der "EAA-Index" (Essential Amino Acid Index) (66), bei dem das sogenannte geometrische Mittel aller essentiellen Aminosäuren im Verhältnis zu einem Referenzprotein (zumeist Eiprotein) berechnet wird.

Der Organismus kann die vorhandenen Aminosäuren jedoch nur ausnutzen, wenn nach einer bestimmten Zeit eine gewisse Konzentration von essentiellen Aminosäuren am Ort der Proteinsynthese vorhanden ist. Dahin gelangen die Aminosäuren, nachdem sie im Verdauungstrakt durch enzymatische Hydrolyse frei-

gesetzt und durch Resorption in den Blutkreislauf transportiert wurden. Während dieser komplizierten Verdauungsvorgänge können sich je nach Art des Nahrungsproteins zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen dem oben genannten potentiellen Nährwert und der tatsächlichen Verwertbarkeit des Proteins und der Aminosäuren ergeben.

Um auch diese sogenannte Aminosäurenverfügbarkeit, d. h. die tatsächliche Proteinqualität messen zu können, wurden verschiedene enzymatische Testverfahren entwickelt, deren Resultate im allgemeinen mit Tierversuchen besser übereinstimmen, als die Ergebnisse chemischer Analysen. Zu derartigen enzymatischen Verfahren gehören z. B. der "PDR-Index" (Pepsin Digest Residue Amino Acid Index) von SHEFFNER et al. (74) und der "Pepsin-Pankreatin-Index" von AKESON und STAHMANN (1). SHEFFNER et al. verglichen das Aminosäurenmuster im löslichen Protein, das nach in vitro "Verdauung" von Proteinen mit Pepsin entsteht, mit der Aminosäurezusammensetzung des unlöslichen Rückstands. Die Werte des "PDR-Index" stimmten gut mit Ergebnissen von Tierversuchen überein, besonders, wenn es sich beim Testmaterial z. B. um hitzebehandelte Proteine handelte. 1964 entwickelten AKESON und STAHMANN einen Pepsin-Pankreatin-Index, eine Modifikation des PDR-Index, wobei sowohl eine Zweistufenhydrolyse mit Pepsin und Pankreatin als auch eine Totalhydrolyse durchgeführt wurde.

Schon 1948 hatten HANKES et al. (31) die enzymatische Hydrolyse von Proteinen der Hydrolyse mit Säuren und Laugen gegenübergestellt und dabei Pepsin allein, Pepsin plus Pankreatin und Pepsin plus Pankreatin plus Erepsin benutzt. MAURON et al. (50, 51) führten 1955 und 1958 in vitro Versuche durch, bei denen sie Milchpulverproben der Hydrolyse durch Pepsin und Pankreatin unterzogen, um die Verfügbarkeit von Lysin und Tryptophan zu bestimmen. Die Arbeiten von MENDEN et al. (53, 54) zeigen die Möglichkeit auf, die Proteinqualität nach abgekürzter, daher unvollständiger enzymatischer Hydrolyse zu ermitteln. Ein anderer Weg wurde von MELNICK und OSER (52) vorgeschlagen. Hierbei wurde mit sehr niedrigen Enzymkonzentrationen gearbeitet. Die Hydrolysendauer mußte allerdings

auf 120 Stunden ausgedehnt werden. Es traten sonst nachteilige Erscheinungen wie Akkumulation der Reaktionsprodukte und Autolyse der Enzyme zu sehr in den Vordergrund.

FORD et al. (26, 27) verwendeten zur enzymatischen Hydrolyse in vitro Pepsin plus Papain, später auch Pronase. Dabei wurden zeitweilig die Proben anschließend mit Sephadex-Gel fraktioniert. Die Arbeitsmethoden von FORD et al. dienen als Grundlage für die vorliegenden Versuche. Die einzelnen Verfahren werden später eingehend besprochen.

2.4 Fraktionierung von Peptiden nach dem Prinzip der Gelfiltration

Bei Sephadex handelt es sich nach den Angaben der Hersteller um ein dreidimensional vernetztes Polysaccharid, das man durch Quervernetzung der linearen Makromoleküle von Dextran gewinnt. Es ist Kationen und Anionen gegenüber indifferent. Sephadex enthält viele OH-Gruppen und ist daher hydrophil, es quillt stark in Wasser und in Elektrolytlösung und bildet ein Gel mit einer Vielzahl von Poren, deren Größe vom Vernetzungsgrad abhängt. Die Gelfiltration beruht auf der eingeschränkten Diffusion der Moleküle in der mit Gelpartikeln gefüllten Säule. Die von dem Gel bei der Quellung aufgenommene Flüssigkeit ist für Moleküle unterschiedlicher Größe in einem von der Porengröße abhängigen Maß verfügbar. Moleküle, die größer sind als die größten Poren des gequollenen Gels, können die Gelkörper nicht durchdringen und wandern an diesen vorbei. Sie verlassen die Säule zuerst. Kleinere Moleküle durchdringen einen mehr oder weniger großen Teil der Gelkörper. Je kleiner die Moleküle sind, desto mehr Poren sind für sie im Gel zugänglich, sie erscheinen daher im Eluat in der Reihenfolge abnehmender Molekulargröße. Da die Molekülgröße im allgemeinen dem Molekulargewicht proportional ist, bietet die Gelfiltration die Möglichkeit zur Trennung von Substanzen mit verschiedenem Molekulargewicht.

Die einzelnen Sephadex-Typen unterscheiden sich charakteristisch in ihrem Quellverhalten. Gele mit hohem Quellungsgrad, bei denen der Matrixanteil nur einen kleinen Teil der Gelmasse

ausmacht (weitmaschigere Vernetzung), eignen sich zum Fraktionieren hochmolekularer Substanzen. Die kompakteren Typen mit geringem Quellungsgrad sind dagegen zum Auftrennen im niedermolekularen Bereich geeignet. Das bei der vorliegenden Arbeit verwendete Sephadex G-25 dient vor allem zur Fraktionierung von Protein mit kleinem Molekulargewicht sowie von Makro- und Oligopeptiden.

3. Eigene Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit wird über "Verdauungs"-Untersuchungen an unterschiedlich hitzegeschädigten Proteinen berichtet. Bei diesen in vitro-Versuchen mit verschiedenen Enzymen wurden stets das enzymatisch lösbare Rohprotein und der Gehalt an enzymatisch freisetzbaren Aminosäuren bestimmt. An einer Proben-Gruppe wurde außerdem eine Gelfiltration mit Sephadex durchgeführt, um festzustellen, ob in bestimmten Fraktionen (lösliches Protein, Peptide, Aminosäuren) bestimmte Aminosäuren angereichert waren.

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Hitzebehandelte Modellgemische aus Sojaprotein und Öl

Für die Untersuchungen wurde isoliertes Sojaprotein (Purina Assay Protein RP 100) verwendet, das durch Säurefällung, Waschung und schonende Trocknung hergestellt worden war. Das Produkt enthielt in der Trockensubstanz 96% Rohprotein, 1,4 % Asche, 0,3 % Fett, 0,2 % Rohfaser und 2% N-freie Extraktstoffe (überwiegend nicht reduzierende Kohlenhydrate). Der Restgehalt an freier Säure betrug 0,1 %.

Dieses isolierte Sojaprotein wurde mit gewichtsgleichen Anteilen Wasser angerührt und dann allein oder nach Zusatz von 10 % Sojaöl hitzebehandelt. Die Hitzebehandlung erfolgte 24 Stunden im Luftstrom bei Temperaturen von 95°C, 115°C, 125°C, 138°C und 160°C. Anschließend wurden die Proben nach dem Soxhlet-Verfahren mit Diäthyläther extrahiert. Um auch während der Ätherextraktion gleiche Bedingungen zu schaffen, wurden den ohne Öl erhitzten Proben zuvor 10 % Sojaöl zugesetzt (80). Der Gehalt der hitzebehandelten Proben an Rohprotein und an Aminosäuren ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1

Gehalt an Rohprotein und an Aminosäuren (g/16g N) in hitze-
behandelten Modellgemischen aus Sojaprotein und Sojaöl

Erhitzungs- temperatur	Sojaprotein						Sojaprotein + 10% Öl			
	+	95°	115°	125°	138°	160°	95°	115°	125°	138° 160°
% Rohprotein	90.2	92.8	92.7	92.5	92.1	92.5	90.0 ⁺⁺	88.0 ⁺⁺	87.5 ⁺⁺	85.4 ⁺⁺ 84.6 ⁺⁺
% Aminosäuren (g/16g N)										
Methionin	1.2	1.0	1.1	1.0	1.1	1.0	1.1	1.0	1.1	1.2 1.0
Lysin	6.6	6.3	6.3	6.6	6.0	5.3	6.4	6.6	6.5	6.0 5.0
Threonin	4.3	4.2	4.3	4.2	4.3	3.5	4.2	4.1	4.1	4.2 3.8
Valin	5.1	5.0	4.8	4.9	5.2	5.0	4.9	4.9	4.8	5.0. 5.1
Isoleucin	5.1	5.1	5.1	5.0	5.1	4.9	5.1	5.0	5.1	5.1 5.0
Leucin	7.9	8.0	8.1	7.9	8.1	7.9	8.0	7.9	8.1	8.1 8.0
Phenylalanin	5.8	5.9	5.9	5.8	5.8	5.6	5.7	5.6	5.8	5.9 5.8
Tyrosin	4.1	4.1	4.1	4.0	4.0	3.9	4.1	3.8	4.1	4.1 3.7
Arginin	8.7	8.3	8.4	8.5	8.5	7.9	8.2	8.5	8.5	8.5 7.7
Histidin	2.8	2.6	2.7	2.8	2.7	2.4	2.8	2.8	2.8	2.7 2.2
Asparagins.	12.1	12.4	12.6	13.0	13.2	12.8	13.1	12.6	13.0	13.1 13.1
Glutamins.	23.2	23.1	23.6	22.7	23.6	22.7	22.8	22.1	23.0	23.2 23.3
Serin	5.6	5.6	5.8	6.0	6.0	5.0	5.7	5.8	6.0	5.8 4.9
Glycic	4.9	4.6	4.7	4.7	4.8	4.7	4.9	4.6	4.6	4.7 4.7
Prolin	5.5	5.2	4.9	5.1	5.0	4.9	5.3	4.9	4.9	5.3 5.4
Alanin	4.5	4.4	4.4	4.6	4.7	4.8	4.7	4.6	4.5	4.8 4.8

- = unehitztes Sojaprotein

++ = Werte nach der Extraktion

Tab. 2 Gehalt an Rohprotein und an Aminosäuren (g/16g N)
nach Hitzebehandlung von Casein allein bzw. in
Gegenwart von Glukose

	Cas. 1 unerh.	Cas. 1 autgkl. 138°	Cas. 1 10% Gluc. autgkl. 138°	Cas. 2 unerh.	Cas. 2 ⁺⁺ all. erh. 110°	Cas. 2 ⁺⁺ 10% Gluc. erh. 90°	Cas. 2 ⁺⁺ 20% Gluc. erh. 105°
%Rohprotein ⁺	74.8	75.7	72.1	81.6	87.0	79.5	73.5
%Aminosäuren (g/ 16gN)							
Methionin	3.1	3.3	3.2	3.2	3.3	3.3	3.0
Lysin	8.8	7.7	5.9	8.5	8.9	6.6	4.6
Threonin	5.3	5.3	5.0	4.4	4.7	4.3	4.2
Valin	7.8	7.8	8.0	7.4	7.1	7.2	7.2
Isoleucin	5.8	5.8	6.0	5.9	5.9	5.9	5.8
Leucin	9.6	10.0	10.1	10.1	10.2	10.3	9.8
Phenylalanin	5.7	5.6	5.7	5.6	5.5	5.5	5.2
Tyrosin	6.0	6.4	6.0	6.2	6.1	5.6	5.4
Arginin	4.1	4.3	2.7	4.1	4.3	3.6	3.2
Histidin	3.4	3.6	3.3	3.5	3.2	2.9	2.9
Asparagins.	8.1	8.0	8.2	7.4	7.8	7.4	7.2
Glutamins.	22.0	20.6	22.0	22.8	26.9	24.0	22.2
Serin	7.0	7.1	6.8	5.8	6.7	6.9	5.7
Glycin	2.1	2.1	2.2	2.4	2.1	2.5	2.5
Prolin	10.0	10.4	10.0	10.4	12.0	10.1	8.7
Alanin	3.5	3.6	3.5	3.5	3.5	3.4	3.8

⁺ Die Rohproteingehalte spiegeln die unterschiedlichen Glukose- und Wassergehalte der einzelnen Chargen wider. Außerdem handelt es sich bei Casein 1 und Casein 2 um Ware aus verschiedener Produktion

⁺⁺ Aufgrund der in mehrfacher Hinsicht unterschiedlichen Hitzebehandlung sollen diese Ergebnisse nicht untereinander sondern jeweils nur mit der unerhitzten Probe verglichen werden

3.1.2 Hitzebehandlung (Autoklavierung) von Casein allein bzw. in Gegenwart von Glukose

Für die Untersuchungen wurde Säurecasein verwendet, das durch Salzsäurefällung, Waschung und Trocknung bei max. 70°C hergestellt worden war. Das Casein enthielt in der Trockensubstanz 96% Rohprotein, 2 % Asche, 1.2 % Fett und 0.6 % Kohlenhydrate (überwiegend Laktose). Der Gehalt an freier Säure betrug max. 0.2 %.

Das Casein wurde allein und mit einem Zusatz von 10 % Glukose 30 Minuten bei einer Temperatur von 138°C autoklaviert und anschließend schonend getrocknet. Der Wassergehalt der Mischung betrug 15 % (19). Der Gehalt der hitzebehandelten Proben an Rohprotein und an Aminosäuren ist in Tabelle 2 aufgeführt.

3.1.3 Hitzebehandlung von Casein (110°C) bzw. von Modellgemischen aus Casein mit 10 % (90°C) und 20 % (105°C) Glukose

3.1.3.1 Casein allein erhitzt (110°C)

Casein wurde mit Wasser im Verhältnis 1 : 1 vermischt und die Mischung bei 105 - 110°C 24 Stunden im Luftstrom getrocknet (19).

3.1.3.2 Casein plus 10 % Glukose erhitzt (90°C)

12 kg Casein wurden mit 1.2 kg Glukose und 12 l Wasser vermischt. Das feuchtkrümelige Gemisch wurde in 2 cm dicker Schicht bei 80 - 90°C 24 Stunden im Luftstrom getrocknet (20).

3.1.3.3 Casein mit 20 % Glukose erhitzt (105°C)

10 kg Casein wurden mit 2 kg Glukose und 25 l Wasser vermischt und in einer 3 cm dicken Schicht im Luftstrom bei 100 - 105°C getrocknet (Dauer 24 Stunden) (20).

Alle Proben, einschließlich der unerhitzten Charge, wurden auf ihren Gehalt an Rohprotein und an Aminosäuren untersucht (s. ebenfalls Tabelle 2).

3.2 Untersuchungsmethoden

3.2.1 Prinzip des enzymatischen "Verdaulichkeitstests"

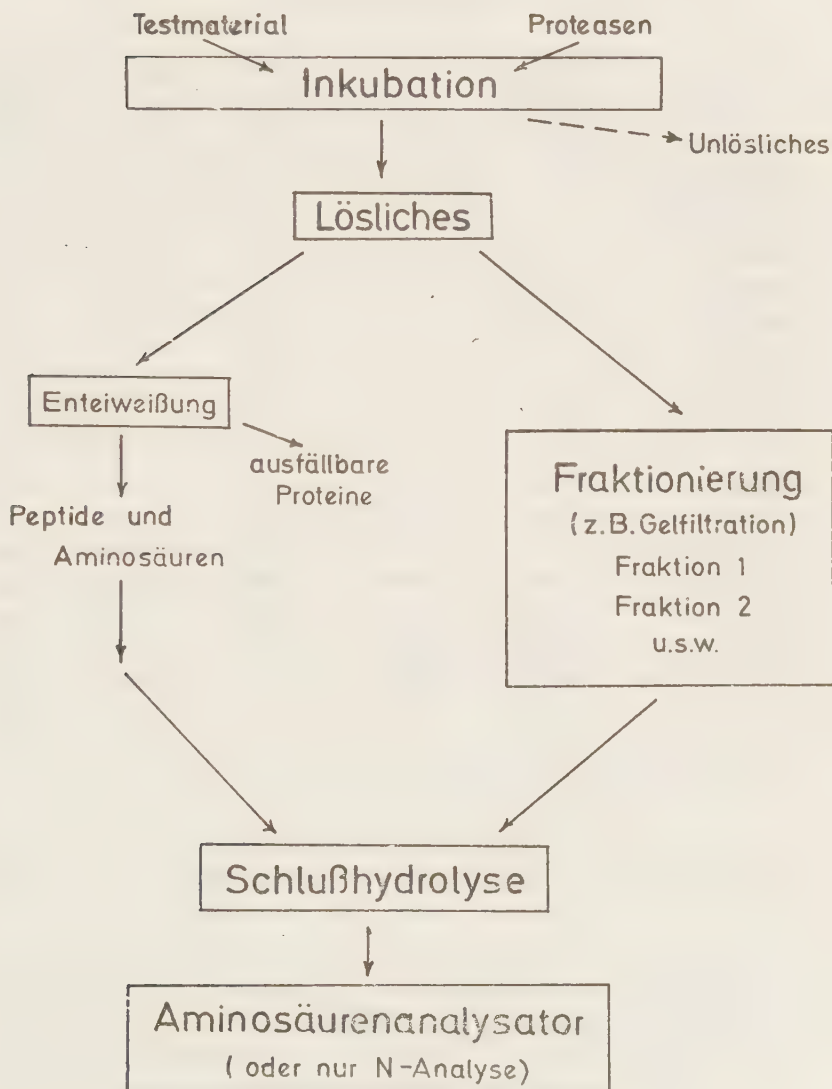
Eine schematische Darstellung des Prinzips des enzymatischen in vitro Tests zur Proteinbewertung zeigt die Abbildung 1 (S. S.15).

3.2.2 Hydrolyse mit den verschiedenen Enzymen

Bei den hier angewandten Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse wurden die durch Selbstverdauung der Enzyme auftretenden Fehlermöglichkeiten nicht eliminiert. Tabelle 3 zeigt die Aminosäurezusammensetzung der verwendeten Enzyme im Vergleich mit der von isoliertem Sojaprotein bzw. Casein (alle Werte in Prozent der lufttrockenen Substanz). Entsprechend dem Anteil der Enzymproteine am Inkubationsansatz ließe sich nach diesen Werten der größtmögliche Fehler (bei 100%iger Selbstverdauung) für die jeweiligen Aminosäuren berechnen.

Abb.1

Enzymatische Proteinhydrolyse Ein in Vitro Test zur Proteinbewertung



Tab. 3 Aminosäurezusammensetzung und Rohproteingehalt der verwendeten Pepsin-, Papain- und Pronasepräparate im Vergleich mit den Werten von isoliertem Sojaprotein bzw. von Casein. Alle Werte sind in Prozent der lufttrockenen Substanz angegeben

	Soja- protein	Casein	Pepsin	Papain	Pronase
% Rohprotein	90.2	87.0	79.1	30.2	44.8
%Aminosäuren (g/ 16g N)					
Methionin	1.1	2.8	0.9	0.1	0.6
Lysin	5.9	7.4	6.3	2.4	1.7
Threonin	3.9	3.8	3.3	1.1	4.8
Valin	4.6	6.4	3.6	2.1	3.4
Isoleucin	4.6	5.1	3.0	1.1	1.7
Leucin	7.1	8.8	4.2	1.4	2.5
Phenylalanin	5.2	4.9	2.6	0.8	1.6
Tyrosin	3.7	5.4	2.6	1.6	3.5
Arginin	7.8	3.6	6.3	1.3	2.4
Histidin	2.5	3.0	2.2	2.5	0.8
Asparagins.	10.8	6.4	6.8	2.6	5.8
Glutamins.	20.9	19.8	9.0	4.1	2.7
Serin	5.0	5.0	4.6	1.4	3.5
Glycin	4.4	2.1	6.6	3.5	3.7
Prolin	4.9	9.1	5.5	1.1	1.4
Alanin	4.0	3.0	4.1	1.1	3.4

3.2.2.1 Hydrolyse mit Pepsin-Salzsäure

(modifiziert nach der Methode des Verbandes der Deutschen Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalten)

2g des Untersuchungsmaterials wurden auf 1 mg genau abgewogen und in einen 500 ml Meßkolben übergeführt. Dann wurden 450 ml einer auf 40°C vorgewärmten Pepsin-Salzsäure-Lösung (0.02 prozentige, frisch hergestellte Lösung von Pepsin in 0.075 N Salzsäure, Pepsin 35 000 E/g von Merck) zugegeben und gut umgeschüttelt, damit sich keine Klumpen bildeten. Der pH-Wert der Suspension mußte zu Beginn des Versuches unter 1.7 liegen. Im Brutschrank wurde die Probe dann bei 40°C gehalten. Jeweils nach 8, 24 und 32 Stunden wurde der Inhalt des Kolbens gut durchgeschüttelt. Nach 48 Stunden wurden 15 ml 8N Salzsäure zugesetzt, der Inhalt des Kolbens auf 20°C abgekühlt, mit Wasser bis zur 500 ml-Marke aufgefüllt und durch ein trockenes Faltenfilter filtriert. Der Rückstand wurde verworfen.

Blindversuch: Pepsin enthält unterschiedliche Mengen Stickstoff, deshalb war ein Blindversuch notwendig. Der Stickstoff wurde im durch Anwendung der gleichen Pepsin- und Salzsäure-Mengen wie im Hauptversuch enthaltenen Filtrat bestimmt.

Weitere Bearbeitung der Proben: Ein aliquoter Teil des Filtrats (200 oder 250 ml) wurde zur Rohproteinbestimmung nach Kjeldahl weiterverarbeitet. Zur Aminosäurenanalyse wurden 5 ml weiterverwendet.

Bei diesem Verfahren machte der Anteil des Enzymproteins vom Gesamtprotein (Substrat plus Enzym) etwa 3,9 % aus.

3.2.2.2 Hydrolyse mit Pronase

Hierbei wurde im Prinzip nach der Methode von FORD (26, 27) vorgegangen.

Es wurden 8g Substanz, entsprechend etwa 1g Stickstoff, eingewogen. In einem Erlenmeyerkolben wurden zu der Probe 200 ml eines Puffers mit pH 8.0 gegeben (0.2M Na- β -Glycerophosphat). Dem Gemisch wurde dann 0.125g Pronase (Merck, Pronase E 70 000 PUK/G für biochemische Zwecke) mit 10 ml Puffer hinzu-

gegeben. Der verschlossene Erlenmeyerkolben wurde kräftig mit der Hand geschüttelt und dann in eine Schüttelapparatur gebracht, wo er bei einer Frequenz von etwa 60 Bewegungen/min im Wasserbad von 56°C geschüttelt wurde. Nach 4 Stunden wurden zur Verhinderung von Bakterienwachstum 8 ml Äthanol zugegeben, der Kolben wurde dann weitere 4 Stunden im Wasserbad geschüttelt und anschließend 13 Stunden lang bei einer Temperatur von 56°C im Brutschrank gehalten. Nach der Inkubation wurde der Erlenmeyerkolben abgekühlt und die Probe 20 Minuten lang zentrifugiert (1800 U/min). Der Überstand wurde außerdem filtriert, das Filtrat wurde in einem 1000 ml-Rundkolben aufgefangen, in einem Vakuumrotationsverdampfer eingeengt und auf 100 ml aufgefüllt. 1 ml der Probe enthielten dann etwa 10 mg Stickstoff. Der Rückstand im Filter wurde nicht untersucht.

Wegen der geringen Menge an Pronase (0.125 g/Probe) wurde ein Blindversuch nicht durchgeführt.

Weitere Bearbeitung der Probe: Von den 100 ml wurden Parallelproben von je 30 ml zur Rohproteinbestimmung verwendet. Für die Aminosäurenanalyse wurden 5 ml weiterverarbeitet.

Bei diesem Verfahren macht der Anteil des Enzymproteins vom Gesamtprotein (Substrat plus Enzym) etwa 0.8 % aus.

3.2.2.3 Hydrolyse mit Pepsin plus Papain

Wie bei der Hydrolyse mit Pronase wurde auch hier nach der Methode von FORD (26, 27) vorgegangen.

Da die Probe etwa 1g Stickstoff enthalten sollte, wurden 8g Substanz eingewogen. Dazu wurden in einen Erlenmeyerkolben 150 ml 0.05 N Salzsäure gegeben und das Gemisch 30 Minuten stehengelassen. Nachdem der pH-Wert mit 1N Salzsäure auf 1.7 gebracht worden war, wurden 100 mg Pepsin dazugegeben und der Erlenmeyerkolben daraufhin 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C geschüttelt. Danach wurde der pH-Wert noch einmal auf 1.7 eingestellt. In den folgenden 8 Stunden wurde der Kolben im Wasserbad geschüttelt und danach in den Brutschrank mit 37°C verbracht. Nach der Gesamtinkubationszeit von 24 Stunden

wurden der Probe 0.6 g Trinatriumcitrat zugegeben und der pH-Wert der Lösung mit 1N Natronlauge auf 6.5 eingestellt. Dann wurden 5 ml einer Natriumcyanid-Lösung (250 mg NaCN in 50 ml Wasser gelöst) zugesetzt und der pH-Wert auf 7.0 gebracht. Anschließend wurden 100 mg Papain und 5 ml schwefelfreies Toluol dazugegeben, das Gemisch zunächst 8 Stunden bei 37°C im Wasserbad geschüttelt und danach noch 16 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde nun durch Zentrifugation gereinigt, filtriert, im Vakuumrotationsverdampfer eingengt und auf 100 ml aufgefüllt, so daß die Probe etwa 5 mg Stickstoff enthielt.

Für die Bestimmung des enzymatisch lösbaren Rohproteins wurden Blindversuche durchgeführt.

Die Weiterverarbeitung der Probe erfolgte wie bei den Versuchen mit Pronase.

Bei diesem Verfahren macht der Anteil des Enzymproteins vom Gesamtprotein (Substrat plus Enzym) etwa 1.4 % aus.

3.2.2.4 Bestimmung der Konzentration enzymatisch freigesetzter Aminosäuren

5 ml der in der beschriebenen Weise enzymatisch aufgeschlossenen Proben wurden zur Enteiweißung mit 25 ml einer 1%igen, wässrigen Pikrinsäurelösung vermischt, der Norleucin als innerer Standard hinzugefügt war. Das so ausgefällte Eiweiß wurde abzentrifugiert (10 Minuten bei 4000 U/min). 25 ml des klaren Überstandes wurden dann über eine Ionenaustauschersäule (Dowex 2 x 10, Cl-Form 200-400 mesh, Austauschersäule mit dem Innendurchmesser von 2 cm, Harzhöhe 2 cm) von der Pikrinsäure gereinigt. Es wurde anschließend 5 mal mit je 3 ml 0.02 N Salzsäure nachgewaschen. Das Eluat wurde im Vakuumrotationsverdampfer bei maximal 60°C auf 1.2 ml eingengt. Dann wurde es 16 Stunden mit 50 ml 6N Salzsäure hydrolysiert, anschließend wieder auf 1.2 ml eingengt, in Citratpuffer pH 2.2 aufgenommen und entsprechend verdünnt. Der Puffer enthielt als Antioxidans 20 ml/l Thiodiglycol, 0.1 ml/l Caprylsäure als Konservierungsmittel und 4.5 ml/l einer 20%igen Brij 35-(Polyoxäthlenaurylalkohol) Lösung.

Die Proben wurden bis zur Analyse bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt.

3.2.3 Gelfiltration mit Sephadex

3.2.3.1 Vorbereitung der Sephadex-Gel-Säule und Chromatographie (2, 26)

150 g des trockenen Gels wurden in Natriumphosphatpuffer (pH 7.6) ($0.02\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$: 0.1 M NaCl wie 1:1) suspendiert, gelegentlich umgerührt und 24 Stunden stehengelassen. Dann wurde die Suspension nach erneutem Umrühren in eine 160 cm hohe Chromatographiesäule mit einem Innendurchmesser von 2.7 cm gegossen. Die endgültige Höhe des Gels betrug 130 cm. Über die Säule wurde eine 5l-Flasche mit Phosphatpuffer gestellt, die durch einen Schlauch mit der Säule verbunden war. Der Flüssigkeitsspiegel der Pufferflasche lag ca. 50 cm über der Geloberfläche; der Pufferzustrom konnte mit einem Hahn reguliert werden. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug ca. 60 ml/h. Um den mikrobiellen Verderb der Proben zu verhindern, wurde die Apparatur in einem Kühlraum mit 4°C aufgebaut.

Für die Trennung wurden 5 ml der Probenlösung (aus den 100 ml der mit Pepsin plus Papain hydrolysierten Probe) auf die Säule aufgetragen. Nachdem die Lösung vollständig in das Gel eingesickert war, wurde mit 5 ml Puffer nachgewaschen. Endlich wurde die Säule mit Puffer aufgefüllt und die Pufferflasche angeschlossen. Bei jedem Lauf wurden mit dem Fraktionssammler ca. 240 Fraktionen mit je 200 Tropfen (ca. 12 ml) aufgefangen und vorübergehend eingefroren. Zur Markierung wurden gleichzeitig drei Indikatorsubstanzen mit bekanntem Molekulargewicht beigelegt. So konnte man an den einzelnen gefärbten Fraktionen ablesen, wie die einzelnen Molekulargewichtsbereiche in der Säule wanderten und eluiert wurden. Als Indikator wurden folgende Substanzen verwendet:

1. Vitamin B₁₂ (Molekulargewicht 1557)
2. Cytochrom C (Molekulargewicht 12400)
3. Dextran Blau (Molekulargewicht 2 000 000)

3.2.3.2 Hydrolyse und Ninhydrinreaktion der Fraktionen

1 ml der Fraktionen wurde mit 3 ml konz. Salzsäure im Wasserbad bei 100°C eine Stunde lang hydrolysiert. Dann wurde mit 5 ml 35%iger Kalilauge neutralisiert und mit Acetatpuffer, pH 5.51, auf 20 ml aufgefüllt. 1 ml davon wurde mit 1 ml Ninhydrinreagens (20 g Ninhydrin in 750 ml Methylcellösolve + 250 ml Acetatpuffer, pH 5.51; dem Ninhydrinreagens wurden kurz vor den Analysen 300 mg Hydrindantin/100 ml Reagens zugesetzt) versetzt und 20 Minuten am Sieden gehalten. Da die Farbe zu kräftig war, wurde nach dem Abkühlen mit 10 ml eines Äthanol-Wassergemischs (1:1) verdünnt. Die Extinktion wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 578 nm ermittelt. Mit Hilfe der Werte wurde die Verteilung der einzelnen Peptide auf die Eluatfraktionen festgestellt und graphisch aufgezeichnet.

3.2.3.3 Vorbereitung zur Aminosäurenanalyse

Die Fraktionen 18 - 32 bzw. 33 - 52 wurden zusammengefaßt und mit 400 ml 6N Salzsäure 24 Stunden lang hydrolysiert. Anschließend wurde mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt. 100 ml davon wurden nach Zugabe von Norleucin als innerem Standard in ähnlicher Weise wie nachfolgend beschrieben (s. 3.2.4.2) eingedampft und in Citratpuffer, pH 2.2, aufgenommen. Die Fraktionen 53 - 82 bzw. 121 - 152 wurden 24 Stunden mit 100 ml 6N Salzsäure hydrolysiert. Nach Zugabe von Norleucin als innerem Standard wurde das Hydrolysat wie nachstehend beschrieben weiterverarbeitet.

3.2.4 Protein- und Aminosäurenanalysen

3.2.4.1 Rohproteinbestimmung

(Methode des Verbandes der Deutschen Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalten)

Aus Einwaagen von 2g des Untersuchungsmaterials wurde nach Kjeldahl (Makroverfahren) der Rohproteingehalt bestimmt. Zur Berechnung des Proteingehaltes wurde der Faktor 6.25 verwendet.

3.2.4.2 Aminosäurenanalyse

Die Aminosäurenanalyse wurde nach salzsaurer Hydrolyse mit Hilfe automatischer Apparaturen (67) zur Ionenaustauschchromatographie nach SPACKMAN, STEIN und MOORE (76) durchgeführt. Dazu wurden - analytisch gewogen - 500 mg des fein gemahlenden, lufttrockenen Untersuchungsmaterials in 800 ml 6N Salzsäure unter Stickstoff 24 Stunden bei Siedetemperatur hydrolysiert. Anschließend wurde das Hydrolysat abgekühlt, mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und filtriert. Davon wurden 100 ml nach Zugabe eines inneren Standards (Norleucin) im Vakuumrotationsverdampfer bei maximal 60°C auf 20 bis 30 ml eingengt. Um die noch vorhandene Salzsäure weitgehend zu entfernen, wurden zweimal etwa 30 ml Wasser zugefügt und jedesmal wieder eingedampft. Endlich wurde mit Citratpuffer mit pH 2.2 auf 100 ml aufgefüllt und der pH-Wert nochmals auf 2.2 eingestellt. 1 ml von diesem analysenfertigen Proteinhydrolysat (angestrebter Gesamtaminosäuregehalt 1.5 bis 2.5 mg) wurde mit Hilfe einer automatischen Apparatur zur Kurzzeitchromatographie⁺ untersucht. Die sauren und neutralen Aminosäuren wurden an einer 60 cm langen, im Innendurchmesser 9 mm starken Ionenaustauschersäule (Kationenaustauscher : Bio-Rad Aminex A 4) bei 50°C Reaktionstemperatur aufgetrennt. Bis zur Elution des Alanins erfolgte die Auftrennung mit einem Citratpuffer pH 3.24, während Valin bis einschließlich Phenylalanin mit einem Citratpuffer pH 4.30 eluiert wurden. Zur Bestimmung der basischen Aminosäuren und des Ammoniaks dienten eine 15 cm lange Säule, eine Reaktionstemperatur für den Ionenaustausch von 55°C und ein Citratpuffer mit pH 5.30.

Das aus beiden Säulen bei einer Durchflußgeschwindigkeit von zumeist 80 ml/h austretende Eluat wurde mit Ninhydrinreagens (20g Ninhydrin, 0.4 g SnCl₂ in 750 ml Methylcellosolve + 250 ml Acetatpuffer, pH 5.51) im Verhältnis 2:1 vermischt und anschließend in einem kalibrierten Teflonschlauch auf 100°C erhitzt. Die Extinktion des sich hierbei entwickelnden blauvioletten Farbkomplexes aus dem Ninhydrin mit der Aminogruppe

⁺ Modell BC 200 der Firma Bio-Cal, München

der entsprechenden Aminosäure wurde mit einem Durchflußcolorimeter bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Extinktion der sich bei der Reaktion des Prolins mit dem Ninhydrin bildenden rötlich-gelben Farbe wurde mit einem zweiten Durchflußcolorimeter bei einer Wellenlänge von 440 nm gemessen. Die Impulse der beiden Colorimeter wurden von einem Zweipunktschreiber aufgezeichnet.

3.2.5 Fehlerbreite des Analysenverfahrens

Die Fehlerbreite der Pepsin-Salzsäure-Methode (N-Bestimmung) liegt nach dem Ergebnis entsprechender Vergleichsuntersuchungen unter $\pm 5\%$ (ERBERSDOBLER, pers. Mitt.). Bei den wichtigen Pepsin plus Papain- und Pronaseverfahren wurde die Fehlerbreite der Analysenmethode durch sechsmalige "Verdauung" desselben Substrats analytisch ermittelt. Das Ergebnis dieser Versuche ist aus Tabelle 4 zu ersehen. Die Reproduzierbarkeit der Testverfahren ist als gut (Pronase) bis befriedigend (Pepsin plus Papain) zu bezeichnen.

Tab. 4 Fehlerbreite der Analysenverfahren

Mittelwerte (n=6) mit Standardabweichung und Streuung in % des Mittelwertes bei der Hydrolyse eines hitzegeschädigten Caseins (Casein + 20 % Glukose bei 105°C erhitzt) mit Pronase und mit Pepsin plus Papain

Aminosäuren	Hydrolyse mit Pronase		Hydrolyse mit Pepsin plus Papain ⁺⁺	
	Mittelwert ± s	Streuung in % des Mit- telwertes	Mittelwert ± s	Streuung in % des Mit- telwertes
Lysin	1.78±0.09	5.0	1.05±0.08	8.0
Histidin	0.85±0.05	6.8	0.65±0.05	8.4
Arginin	0.88±0.04	4.6	0.55±0.05	10.0
Methionin	1.15±0.05	4.8		
Threonin	1.57±0.05	3.3		
Valin	2.57±0.10	4.0		
Isoleucin	2.07±0.05	2.5		
Leucin	3.55±0.23	6.3		
Phenylalanin	1.90±0.06	3.3		
Tyrosin	1.95±0.05	2.8		
Asparagins.	2.60±0.06	2.4		
Glutamins.	8.70±0.33	3.8		
Serin	2.04±0.05	2.7		
Glycin	0.66±0.05	8.3		
Prolin	3.84±0.21	5.4		
Alanin	1.14±0.08	7.8		
Furosin			1.14±0.08	7.8
enzymatisch lösbares Rohprotein:				
	92.3±3.55	3.9	79.9±3.01	3.8

⁺⁺ Bei der Hydrolyse mit Pepsin plus Papain wurden nur die basischen Aminosäuren bestimmt

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Hitzebehandeltes Sojaprotein sowie hitzebehandelte Modellgemische aus Sojaprotein und Sojaöl

Bei diesen Versuchen sollte vor allem festgestellt werden, inwieweit die enzymatische Freisetzung der Aminosäuren durch die Intensität der Hitzebehandlung beeinflusst wird. Außerdem sollte überprüft werden, ob es bei Hitzebehandlung in Gegenwart von Sojaöl zu einer verstärkten Aminosäureschädigung kommt. Zu diesem Zweck wurden angefeuchtete Proben eines isolierten Sojaproteins ohne und mit 10 % Sojaöl 24 Stunden lang bei Temperaturen von 95°C, 115°C, 125°C, 138°C und 160°C erhitzt. Nach der Hitzebehandlung wurde das Fett, soweit möglich, mit Äther extrahiert (s. hierzu auch 3.1.1).

Sämtliche Proben wurden einer Hydrolyse mit Pronase bzw. Pepsin plus Papain unterzogen. Bei allen Analysen wurde in einer Doppelbestimmung der Gehalt an enzymatisch lösbarem Rohprotein festgestellt. Aus einer Teilprobe der löslichen Fraktion wurde weiterhin durch Eiweißfällung eine Fraktion der Peptide und Aminosäuren erhalten. Diese Fraktion wurde nach Schlußhydrolyse mit 6N Salzsäure auf den Gehalt an Aminosäuren untersucht. Alle Analysenwerte wurden auf den Gehalt des Testmaterials an Rohprotein ($N \times 6.25$) bezogen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 5 und 6 sowie in der Abbildung 2 zusammengefaßt.

In den Tabellen 5 und 6 werden die Gehalte für die enzymatisch freisetzbaren Aminosäuren im auf 95°C ohne bzw. mit Öl erhitzten Sojaprotein sowie die entsprechenden Relativwerte bei den stärker erhitzten Proben wiedergegeben. In der Abbildung 2 ist der Abfall an Aminosäuren graphisch dargestellt, wobei die Werte für die jeweils ohne bzw. mit Öl erhitzten Proben gemittelt wurden. Man erhält auf diese Weise Doppelwerte, die allerdings unter ungünstigen Bedingungen zustandegekommen sind. Die Einzelwerte variieren demnach auch stärker als dies aus den Versuchen über den Analysenfehler (s. 3.2.5) erwartet werden konnte.

3.3.1.1 Hydrolyse mit Pronase

Die Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die Auswirkung der angewandten Temperaturen auf den Gehalt an enzymatisch freigesetzten Aminosäuren. Bei der auf 138°C erhitzten Sojaproteinprobe war eine deutliche Verminderung der Aminosäurenwerte in Höhe von durchschnittlich 20 % festzustellen. Lysin fiel sogar um 25 % ab. Bei den auf 160°C erhitzten Proben sanken die Aminosäurenwerte auf zumeist nur noch 20 % ab. Bei den mit Öl erhitzten Proben wurden im Prinzip ähnliche Ergebnisse erhalten, wenngleich die bei 115°C und 125°C erhitzten Proben scheinbar etwas günstiger abgeschnitten hatten.

Das mit Pronase lösbare Rohprotein nahm mit zunehmender Hitzebelastung ab, wobei die Werte für die mit Öl erhitzten Proben niedriger lagen. Der stärkste Abfall war bei den auf 160°C erhitzten Proben festzustellen.

3.3.1.2 Hydrolyse mit Pepsin plus Papain

Die Ergebnisse der "Verdauungsversuche" mit Pepsin plus Papain zeigt Tabelle 6. Bei den auf 125°C, 138°C und 160°C erhitzten Sojaproteinproben ließen sich "Verluste" von etwa 10 %, 33 % und 80 % feststellen. Methionin zeigte eine etwas stärkere Abnahme als die übrigen Aminosäuren. Als besonders geschädigt erwies sich auch das Lysin, das bei 138°C auf fast 50 % und bei 160°C auf nur noch 12 % des Ausgangswertes erniedrigt war. Histidin und Arginin bleiben bis 125°C unverändert, bei 138°C verringerten sich die Werte um 20 %, während bei 160°C kein freies Arginin mehr festzustellen war. Die Aminosäurenwerte der mit Sojaöl auf 138°C erhitzten Probe waren im Vergleich zu den auf 95°C erhitzten Proben nicht verringert. Bei Methionin und den basischen Aminosäuren traten dagegen stärkere Verluste (über 25 %) auf. Bei der auf 160°C erhitzten Probe waren alle Aminosäuren auf nur noch 25 % des Ausgangsgehaltes abgefallen.

Das mit Pepsin plus Papain lösbare Rohprotein nahm abhängig von der Erhitzungstemperatur ab, wobei die Werte bei den ohne Öl erhitzten Proben deutlich höher lagen, als bei den mit Öl erhitzten Proteinen.

Tab. 2

Gehalt an lösbarem Rohprotein (des Gesamt-Rohproteins) und an enzymatisch freisetzbaren Aminosäuren (g/16g Gesamt-N bzw. Relativwerte) in verschiedenen hitzebehandelten Modellgemischen aus Sojaprotein und Sojaöl

Hydrolyse mit Pronase

Sojaprotein

Sojaprotein+ 10% Öl

Erhitzungs- temperatur	95°	115°	125°	138°	160°	95°	115°	125°	138°	160°
Proteinlös- barkeit in% (1x6.25)	85/86	80/81	74/75	64/65	15/15	83/84	74/74	71/72	55/56	12/12
freigesetzte Aminosäuren (g/16g Gesamt-N bzw. die entsprechenden Relativwerte)										
Methionin	1.6=100	94	100	88	13	1.8=100	94	94	105	0
Lysin	4.3=100	98	98	74	9	3.8=100	110	97	61	11
Threonin	5.0=100	90	96	82	16	4.4=100	107	111	77	14
Valin	6.8=100	88	96	81	16	6.3=100	103	105	75	14
Isoleucin	6.1=100	87	95	80	21	5.2=100	106	65	52	12
Leucin	9.9=100	89	94	81	15	8.9=100	101	106	74	12
Phenylalanin	6.5=100	91	95	83	15	5.7=100	98	91	69	11
Tyrosin	4.2=100	98	100	91	14	3.7=100	95	118	70	13
Arginin	4.8=100	102	104	87	27	4.2=100	126	117	91	0
Histidin	2.6=100	66	66	54	8	1.6=100	106	88	69	0
Asparagins.	15.1=100	94	94	91	20	14.6=100	99	106	64	14
Glutamins.	23.3=100	98	100	95	18	21.4=100	105	121	83	24
Serin	7.3=100	92	99	85	15	6.4=100	103	114	77	11
Glycin	5.1=100	98	96	88	22	4.8=100	100	110	73	14
Prolin	6.1=100	99	105	100	18	6.2=100	79	102	74	0
Alanin	5.4=100	93	96	83	19	4.9=100	102	108	76	24

Tab. 5

Gehalt an lösbarem Rohprotein (% des Gesamt- Rohproteins) und an enzymatisch freisetzbaren Aminosäuren (g/16g Gesamt-N bzw. Relativwerte) in verschiedenen hitzebehandelten Modellgemischen aus Sojaprotein und Sojaöl

Hydrolyse mit Pepsin plus Papain

Erwärmungs- temperatur	Sojaprotein					Sojaprotein+10% Öl				
	95°	115°	125°	138°	160°	95°	115°	125°	138°	160°
Proteinlös- barkeit in % (1x6,25)	82/83	77/78	77/77	66/67	21/22	78/79	73/73	67/69	54/54	14/14
freie, freisetzbare Aminosäuren (g/16g Gesamt-N bzw. die entsprechenden Relativwerte)										
Methionin	0.8=100	89	75	50	13	0.8=100	88	88	75	13
Lysin	3.3=100	97	88	52	12	3.0=100	90	80	67	17
Threonin	2.9=100	97	90	59	21	2.7=100	93	93	93	15
Valin	3.6=100	97	84	70	25	3.1=100	103	100	103	19
Isoleucin	3.1=100	94	84	68	19	2.7=100	100	96	100	15
Leucin	5.4=100	94	85	74	22	4.9=100	96	94	96	22
Phenylalanin	3.4=100	88	91	74	24	3.0=100	100	103	100	14
Glutaminsäure	2.7=100	85	89	67	18	2.6=100	77	85	85	15
Arginin	3.2=100	100	100	78	0	3.1=100	103	84	68	13
Histidin	0.9=100	100	110	78	0	0.8=100	88	88	63	25
Asparaginsäure	9.1=100	95	88	48	20	8.3=100	94	93	93	16
Glutaminsäure	15.1=100	96	85	60	21	12.2=100	107	105	106	21
Serin	4.3=100	95	89	70	21	4.0=100	95	93	90	15
Glycin	3.1=100	94	87	71	26	2.8=100	99	93	97	21
Prolin	3.4=100	88	85	77	32	3.1=100	103	103	107	26
Alanin	3.3=100	91	88	73	24	3.0=100	94	93	94	17

Abb.2a Auswirkung einer Hitzebehandlung von isoliertem Sojaprotein auf die Freisetzung von Aminosäuren und Peptiden (angegeben als freie Aminosäuren) durch enzymatische Hydrolyse.

(Werte für die auf 95°C erhitzten Proben = 100)

□ = Hydrolyse mit Pronase

▨ = Hydrolyse mit Pepsin plus Papain

Mittelwerte aus : T = Sojaprotein • = Sojaprotein mit Öl

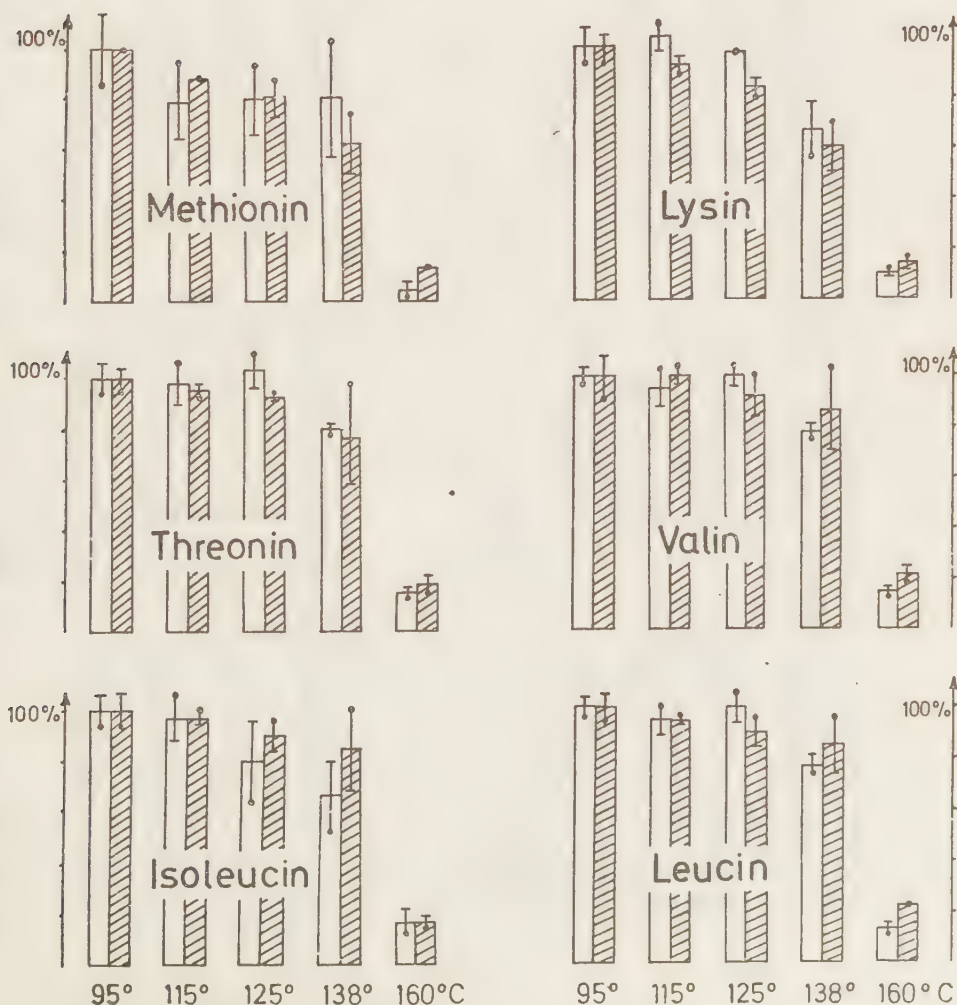
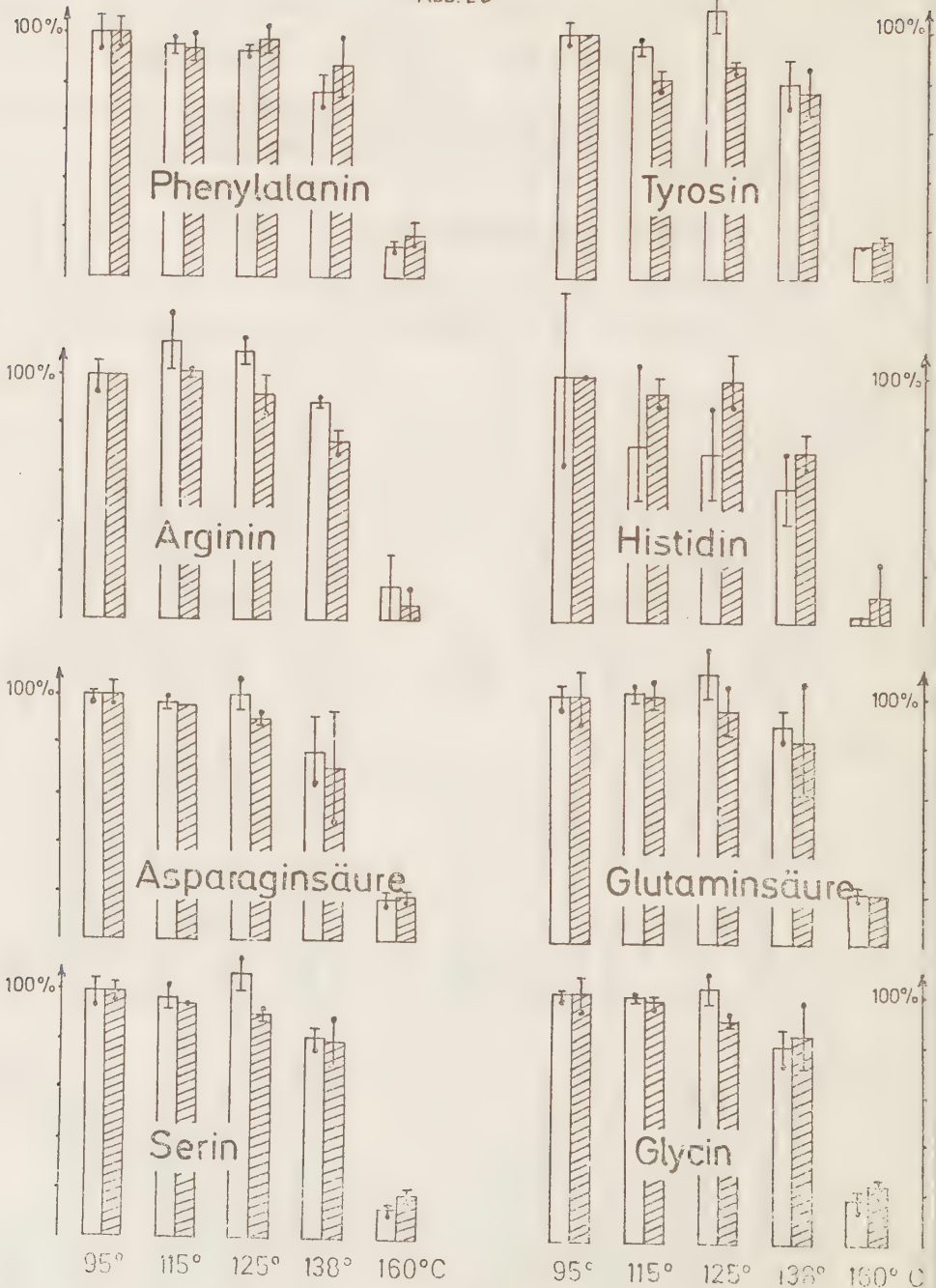


Abb. 26



3.3.2 Hitzebehandlung (Autoklavierung) von Casein allein bzw. in Gegenwart von Glukose

In diesen Versuchen sollte festgestellt werden, ob eine Hitzebehandlung von Casein mit Glukose die in vitro "Verdaulichkeit" des Proteins stärker beeinträchtigt als dieselbe Erhitzung ohne reduzierende Zucker. Dazu war Casein allein oder mit einem Zusatz von 10 % Glukose 30 Minuten bei 138°C autoklaviert worden (Wassergehalt stets 15 %). Die Aminosäurezusammensetzung der so behandelten Proben ist in Tabelle 2 zusammengefaßt (S. 13).

Mit dem erhitzten Casein und den autoklavierten Proben wurde eine Hydrolyse mit Pepsin- Salzsäure, Pronase sowie Pepsin plus Papain durchgeführt. Die Weiterbehandlung der hydrolysierten Proben erfolgte wie unter 3.3.1 beschrieben.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen Tabelle 7 und Abbildung 3. In der Tabelle 7 werden die Gehalte für die enzymatisch freisetzbaren Aminosäuren im unerhitzten Casein sowie die entsprechenden Relativwerte bei den hitzebehandelten Proben wiedergegeben. In der Abbildung 3 dagegen werden die enzymatisch freisetzbaren Aminosäuren auf den Brutto-Aminosäuregehalt (Chemische Analyse) im unerhitzten Casein bezogen. Aus den Tabellenwerten ist somit die Verminderung der sogenannten relativen in vitro "Verdaulichkeit" durch die Hitzebehandlung am besten abzulesen, während die Abbildung einen Vergleich der Aktivität und zum Teil der Wirkungsspezifität der verschiedenen Enzymwendungen erlaubt.

3.3.2.1 Hydrolyse mit Pepsin-Salzsäure

Im Vergleich zum unerhitzten Casein lagen die Werte an freisetzbaren Aminosäuren beim autoklavierten Casein um durchschnittlich 15 - 20 % niedriger, das Lysin war sogar um 29 % herabgesetzt. Die Werte bei der mit Glukose autoklavierten Probe lagen um weitere 10 % darunter. Methionin war ganz verloren gegangen und Lysin um nahezu 50 % des Ausgangswertes vermindert.

Das mit Pepsin-Salzsäure lösbares Rohprotein lag für das unerhitzte und das autoklavierte Casein etwa gleich hoch, bei dem mit Glukose autoklavierten Casein lag es nur um 7 % niedriger.

3.3.2.2 Hydrolyse mit Pronase

Zwischen dem unbehandelten und dem erhitzten Casein ließen sich nach der Hydrolyse mit Pronase keine wesentlichen Unterschiede im Gehalt an freisetzbaren Aminosäuren feststellen. Lysin, Histidin und Alanin lagen bei der erhitzten Probe sogar etwas höher als bei dem unerhitzten Casein. Bei dem zusammen mit Glukose erhitzten Casein dagegen waren wesentlich niedrigere Werte feststellbar.

Das mit Pronase lösbare Rohprotein war beim erhitzten Casein um 10 %, bei der mit Glukose erhitzten Probe um nur 14 % erniedrigt.

3.3.2.3 Hydrolyse mit Pepsin plus Papain

Hier waren die Gehalte an freigesetzten Aminosäuren beim autoklavierten Casein um durchschnittlich 15 % erniedrigt. Bei der mit Glukose erhitzten Probe lagen die entsprechenden Gehalte bei 70 % der Ausgangswerte. Methionin und Lysin waren mit einer Abnahme von 41 % am stärksten betroffen.

Das mit Pepsin plus Papain lösbare Rohprotein war für das unerhitzte und das autoklavierte Casein etwa gleich hoch, die Werte des mit Glukose erhitzten Caseins lagen nur 5 % darunter.

3.3.3 Hitzebehandlung von Casein (110°C) bzw. von Modellgemischen aus Casein mit 10 % (90°C) und 20 % (105°C) Glukose

In diesen Versuchen wurde der Einfluß einer unterschiedlichen Hitzebelastung von Casein ohne und mit Glukose auf die Wirksamkeit der enzymatischen Hydrolyse festgestellt. Dazu wurden Casein allein bei 110°C, Casein mit 10 % Glukose bei 90°C und Casein mit 20 % Glukose bei 105°C im Luftstrom erhitzt. Die Erhitzung dauerte jeweils 24 Stunden (s. auch 3.1.3). Die Aminosäurezusammensetzung dieser Proben und des unerhitzten Caseins sind in Tabelle 2 zusammengestellt (S. 13).

An sämtlichen Proben wurde eine "Verdauung" mit Pepsin-Salzsäure, Pronase und Pepsin plus Papain durchgeführt. Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte wie unter 3.3.1 beschrieben. Die Untersuchungsergebnisse zeigt die Tabelle 8.

Tab. 7 Gelblich an löslichem Rohprotein (w des Gesamt- Rohproteins) und an enzymatisch freigesetzten Aminosäuren (g/ 16g Gesamt- N bzw. Relativwerte) in unbehandeltem Casein (I) und in hitzebehandelten Modellgemischen aus Casein allein (II) bzw. in Gegenwart von 10% Glukose (III). (Autoklavierung bei 138°C)

Hydrolyse mit Pepsin- Salzsäure	Hydrolyse mit Pronase	Hydrolyse mit Pepsin plus Papain
------------------------------------	--------------------------	-------------------------------------

I	II	III	I	II	III	I	II	III
---	----	-----	---	----	-----	---	----	-----

Proteinlösbarkeit in % (1 x 6.25)

95/96	97/97	89/90	97/98	88/88	84/84	96/97	95/96	91/91
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

freigesetzte Aminosäuren (g/ 16g Gesamt-N bzw. die entsprechenden Relativwerte)

Methionin	1.3=100	85	0	3.1=100	94	45	2.9=100	83	59
Lysin	6.9=100	71	54	7.8=100	107	68	6.3=100	73	55
Threonin	5.8=100	84	74	4.7=100	94	51	4.9=100	86	67
Valin	8.5=100	82	88	8.2=100	85	60	6.8=100	85	76
Isoleucin	5.6=100	82	78	5.4=100	96	59	4.4=100	82	68
Leucin	11.1=100	81	87	9.8=100	92	55	8.7=100	84	71
Phenylalanin	5.1=100	90	69	6.0=100	92	48	4.4=100	75	66
Tyrosin	6.3=100	78	67	6.1=100	90	49	4.9=100	82	65
Arginin	2.5=100	100	76	4.0=100	93	28	2.3=100	109	65
Histidin	1.5=100	80	94	2.4=100	112	58	1.3=100	84	84
Asparagin.	9.5=100	84	79	7.1=100	89	47	7.5=100	61	63
Glutamins.	29.4=100	75	77	18.3=100	93	59	23.0=100	85	83
Serin	8.3=100	80	71	4.6=100	100	65	5.5=100	95	75
Glycin	2.4=100	88	88	2.0=100	100	50	2.0=100	85	70
Prolin	18.4=100	72	93	10.8=100	94	55	10.0=100	81	66
Alanin	3.5=100	92	80	3.1=100	103	55	2.9=100	86	66

Abb.3a Auswirkung der Hitzebehandlung von Casein allein bzw. in Gegenwart von Glukose auf die Freisetzung von Aminosäuren und Peptiden (angegeben als freie Aminosäuren) durch enzymatische Hydrolyse.

(Aminosäuregehalte nach der chemischen Analyse im unerhitzten Casein = 100)

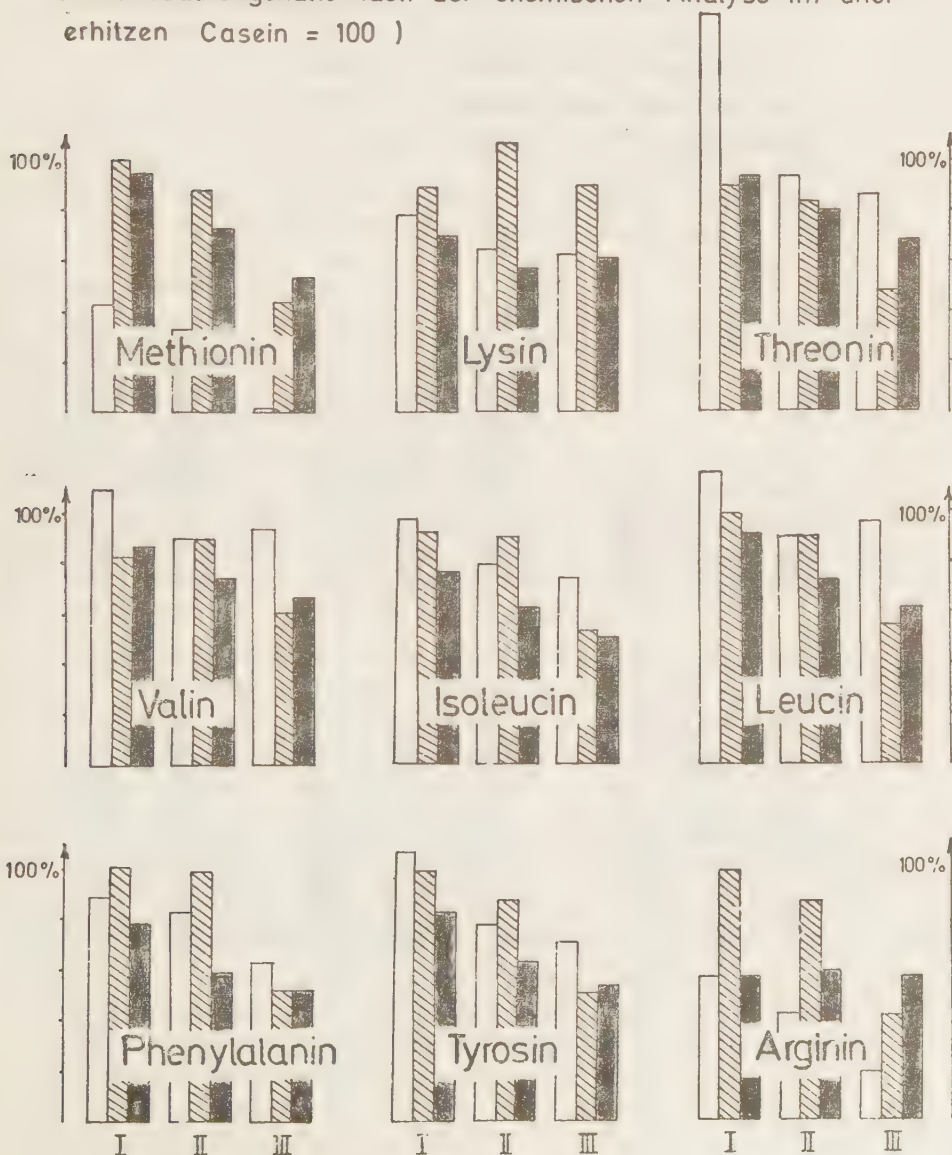


Abb.3b.

I unerhitztes Casein

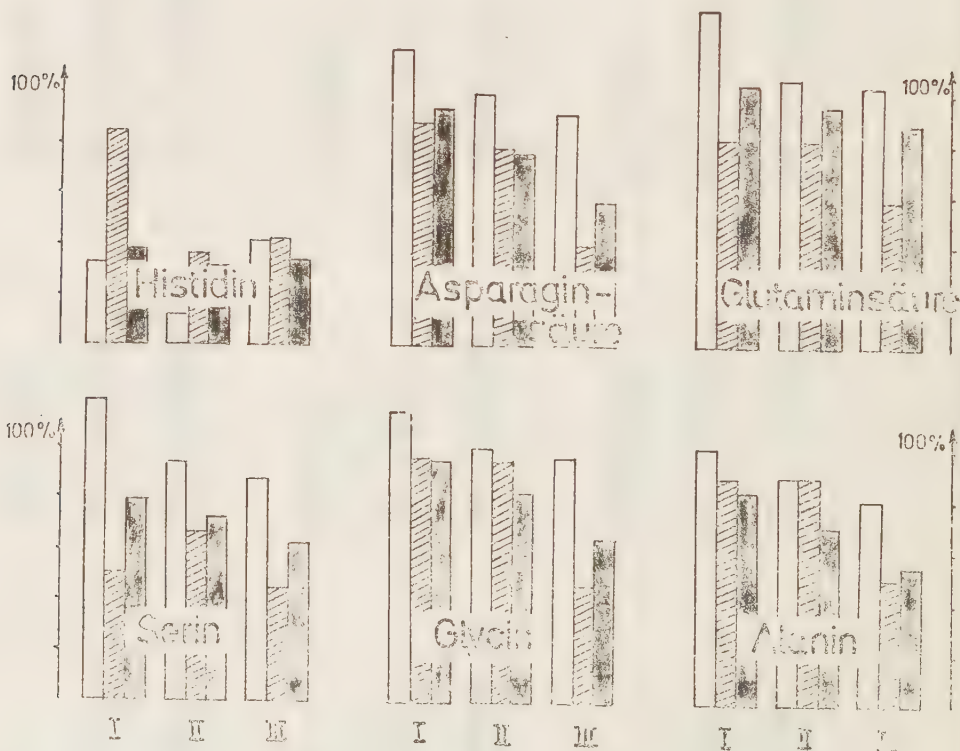
II autoklaviertes Casein (bei 138°C)

III mit 10% Glukose autoklaviertes Casein (bei 138°C)

□ Hydrolyse mit Pepsin - Salzsäure

▨ Hydrolyse mit Pronase

■ Hydrolyse mit Pepsin plus Papain



3.3.3.1 Hydrolyse mit Pepsin-Salzsäure

Im Vergleich mit der unerhitzten Probe lagen die Aminosäurenwerte beim allein erhitzten Casein um 10 - 15 % niedriger. Arginin, Glycin, Alanin und Threonin waren dabei nicht betroffen. Beim Methionin dagegen war der Gehalt um 38 %, beim Lysin um 22 % erniedrigt. Die Werte bei dem mit 10 % Glukose bei 90°C erhitzten Casein lagen in der gleichen Größenordnung wie beim unerhitzten Protein, lediglich der Methioningehalt wich stärker von dem des unerhitzten Caseins ab. Beim Casein, das mit 20 % Glukose bei 105°C erhitzt wurde, war das Ausmaß der enzymatischen Hydrolyse deutlich verringert. Dabei lagen Lysin, Serin und Glutaminsäure besonders niedrig.

Das mit Pepsin-Salzsäure lösbares Rohprotein war nur bei der mit 20 % Glukose erhitzten Probe herabgesetzt.

3.3.3.2 Hydrolyse mit Pronase

Hier konnte zwischen dem unerhitzten und dem hitzebehandelten Casein kaum ein Unterschied festgestellt werden. Nur Valin lag mit 78 % relativ niedrig. Bei der mit 10 % Glukose erhitzten Probe war Lysin auf 51 %, Histidin auf 67 %, Valin auf 72 % und Arginin auf 75 % der entsprechenden Werte beim unerhitzten Casein vermindert.

Bei durchschnittlich nur noch 40 % der Ausgangswerte lagen die enzymatisch freigesetzten Aminosäuren bei der auf 105°C mit Glukose erhitzten Caseinprobe. Lysin und Arginin waren hierbei am meisten betroffen (23 bzw. 25 % des Ausgangswertes).

Wie bei der mit Pepsin-Salzsäure hydrolysierten Probe war das enzymatisch lösbares Rohprotein erst bei der mit 20 % Glukose erhitzten Probe vermindert.

3.3.3.3 Hydrolyse mit Pepsin plus Papain

Die Werte beim erhitzten Casein lagen für fast alle Aminosäuren etwas niedriger als beim unbehandelten Casein. Demgegenüber waren die Werte der mit 10 % Glukose erhitzten Probe deutlich niedriger, besonders beim Lysin, Arginin

und Methionin mit jeweils 61 %, 70 % und 76 %. Noch niedriger lagen die Werte bei dem mit 20 % Glukose erhitzten Protein, wobei vor allem Lysin, Arginin und Histidin (auf 16 %, 26 % und 31 %) erniedrigt waren.

Die Werte für das enzymatisch lösbares Rohprotein lagen in der gleichen Größenordnung wie die bei der Hydrolyse mit Pronase.

Tab. 8 Gehalt an lösbarem Rohprotein (in Prozent des Gesamt-Rohproteins an enzymatisch freisetzbaren Aminosäuren (g/ 16 g Gesamt-N) in unbehandeltem Casein und in Modellgemischen aus erhitztem Casein und Casein plus 10% bzw. 20% Glukose erhitzt

	Hydrolyse mit Pepsin-Salzsäure				Hydrolyse mit Pronase				Hydrolyse mit Pepsin-Papain			
	Casein unerh.	Casein ⁺ erh. 110°	Casein ⁺ 10 % Glukose erh. 90°	Casein ⁺ 20 % Glukose erh. 105°	Casein ⁺ unerh.	Casein ⁺ erh. 110°	Casein ⁺ 10 % Glukose erh. 90°	Casein ⁺ 20 % Glukose erh. 105°	Casein unerh.	Casein ⁺ erh. 110°	Casein ⁺ 10 % Glukose erh. 90°	Casein ⁺ 20 % Glukose erh. 105°
Proteinlösbarkeit in %	95/96	91/92	91/92	86/87	97/98	97/98	92/93	88/89	96/97	98/98	90/92	79/80
freigesetzte Aminosäuren (g/ 16g Gesamt-N) bzw. Relativwerte												
Methionin	1.3=100	62	52	77	3.1=100				2.9=100	86	76	41
Lysin	6.9=100	78	78	40	7.8=100	97	97	39	6.3=100	88	61	16
Threonin	4.8=100	98	104	50	4.7=100	105	51	24	4.9=100	88	84	47
Valin	8.5=100	87	87	53	8.2=100	96	85	34	6.8=100	94	88	47
Isoleucin	5.6=100	86	97	48	5.4=100	78	72	33	4.4=100	96	84	48
Leucin	11.1=100	86	85	51	9.8=100	98	91	39	8.7=100	90	84	46
Phenylalanin	5.1=100	86	94	51	6.0=100	102	93	37	4.4=100	86	80	48
Tyrosin	6.3=100	92	95	48	6.1=100	87	83	32	4.9=100	88	80	34
Arginin	2.5=100	104	96	60	4.0=100	95	90	31	2.3=100	91	70	26
Histidin	1.5=100	93	80	80	2.4=100	88	75	22	1.3=100	100	77	31
Asparagins.	9.5=100	85	85	47	7.1=100	116	67	37	7.5=100	87	79	45
Glutamins.	29.4=100	83	80	43	18.3=100	87	90	37	23.0=100	90	78	44
Serin	8.3=100	84	94	41	4.6=100	100	98	49	5.5=100	93	85	55
Glycin	2.4=100	104	100	58	2.0=100	100	94	46	2.0=100	90	85	45
Prolin	18.4=100	81	81	77	10.8=100	100	95	30	10.0=100	86	77	41
Alanin	3.5=100	95	100	52	3.1=100	137	108	36	2.9=100	107	86	48
						103	97	36				

⁺ Aufgrund der in mehrfacher Hinsicht unterschiedlichen Hitzebehandlung sollen diese Ergebnisse nicht untereinander sondern jeweils nur mit der unerhitzten Probe verglichen werden.



3.3.4 Gelfiltration mit Sephadex G- 25

Um die bei der enzymatischen Hydrolyse von Proteinen erhaltenen Spaltprodukte (Peptidbruchstücke) entsprechend ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Gelfiltration mit Sephadex durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden unerhitztes Casein, autoklaviertes Casein und zusammen mit Glukose autoklaviertes Casein herangezogen. Die Hydrolyse wurde mit Pepsin plus Papain durchgeführt. Zur Gelfiltration wurde Sephadex G- 25 verwendet, das in einem Molekulargewichtsbereich von 100 - 5000⁺ auftrennt. Wie aus dem Elutionsdiagramm hervorgeht (Abb. 4), umfaßte die erste Fraktion einen Molekulargewichtsbereich von 2.000.000 (Dextran Blau) bis etwa 5000. Im Bereich der zweiten Fraktion lagen alle Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 5000 bis ca. 500. Die Oligopeptide mit einem Molekulargewicht kleiner als 500 wurden in der dritten Fraktion zusammengefaßt, während die vierte Gruppe die Aminosäuren und gegebenenfalls kleinere Peptide repräsentierte.

Man kann also erwarten, daß die Substanzen in Fraktion 1 den weniger gut verdauten Anteil des Proteins darstellen, während die Moleküle in Fraktion 2 und 3 besser bzw. gut hydrolysiert worden waren. In Fraktion 4 wären die freien Aminosäuren und möglicherweise kleinere Peptide zu erwarten gewesen.

⁺ Dieser Fraktionsbereich (ungefährer Molekulargewichtsbereich, in dem die Stoffgemische nach Molekülgrößen getrennt werden) gilt streng genommen allerdings nur für Polysaccharide. Die Werte bei Proteinen liegen höher, wie auch die Ergebnisse von FORD und SALTER (26) vermuten lassen.

Gelfiltration mit Sephadex G-25 von zwei Testproteinen; Elutionsdiagramm der einzelnen Fraktionen.

x — x Cas. unerhitzt

⊗ — ⊗ Cas. + 10% Gluc. autokl. (138°)

Markierungssubstanzen: Blue Dextran (B-D)

Vit. B₁₂ (B₁₂)

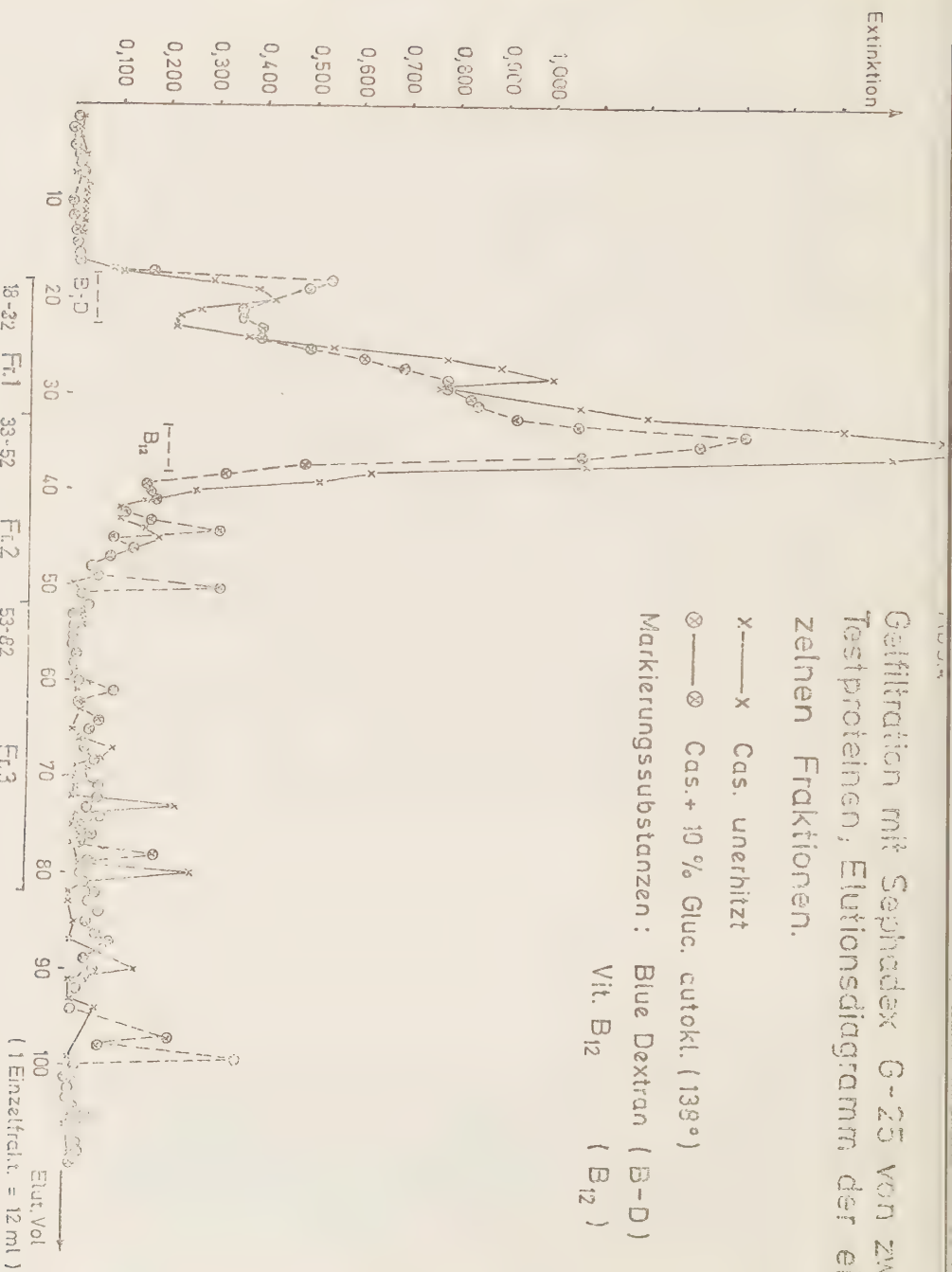


Abb.5a Aminosäuregehalt der einzelnen Fraktionen nach Gelfiltration (Sephadex G 25) der enzymatisch hydrolysierten Proteine Casein (I), Casein⁺ erhitzt (II) und Casein mit Glukose erhitzt (III). Erhitzung jeweils 30 Min bei 138°C.

- Fraktion 1 (MG > ca 5000)
 ■ Fraktion 2 (MG ca 5000 bis ca 500)
 ▨ Fraktion 3 (MG < ca 500)

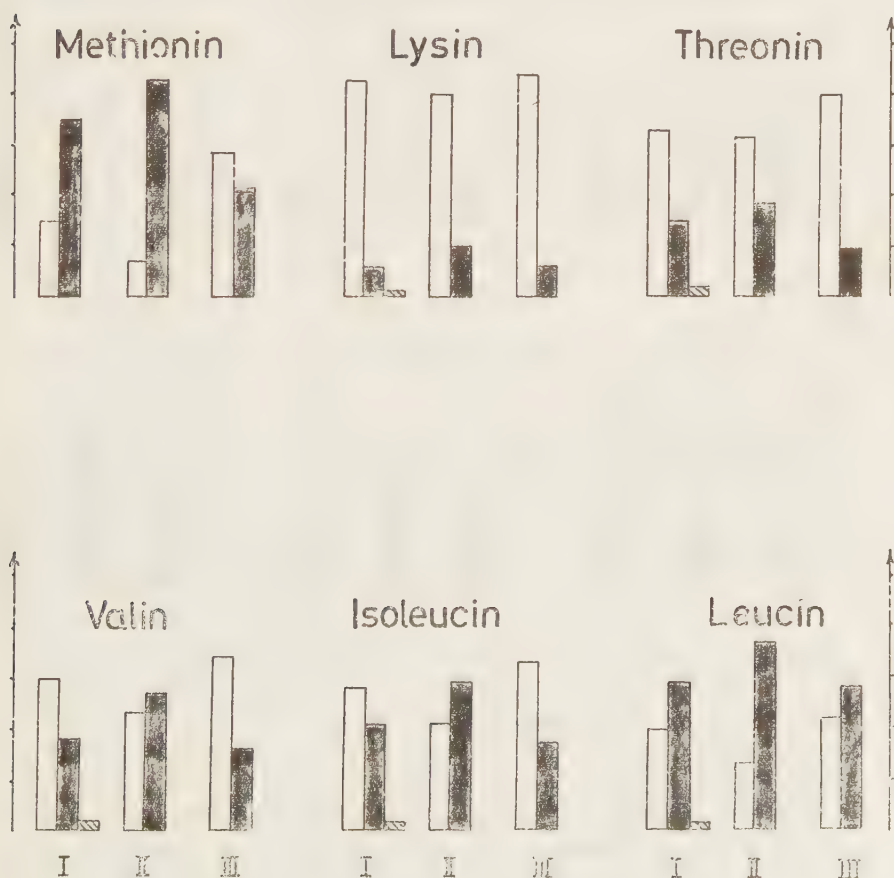
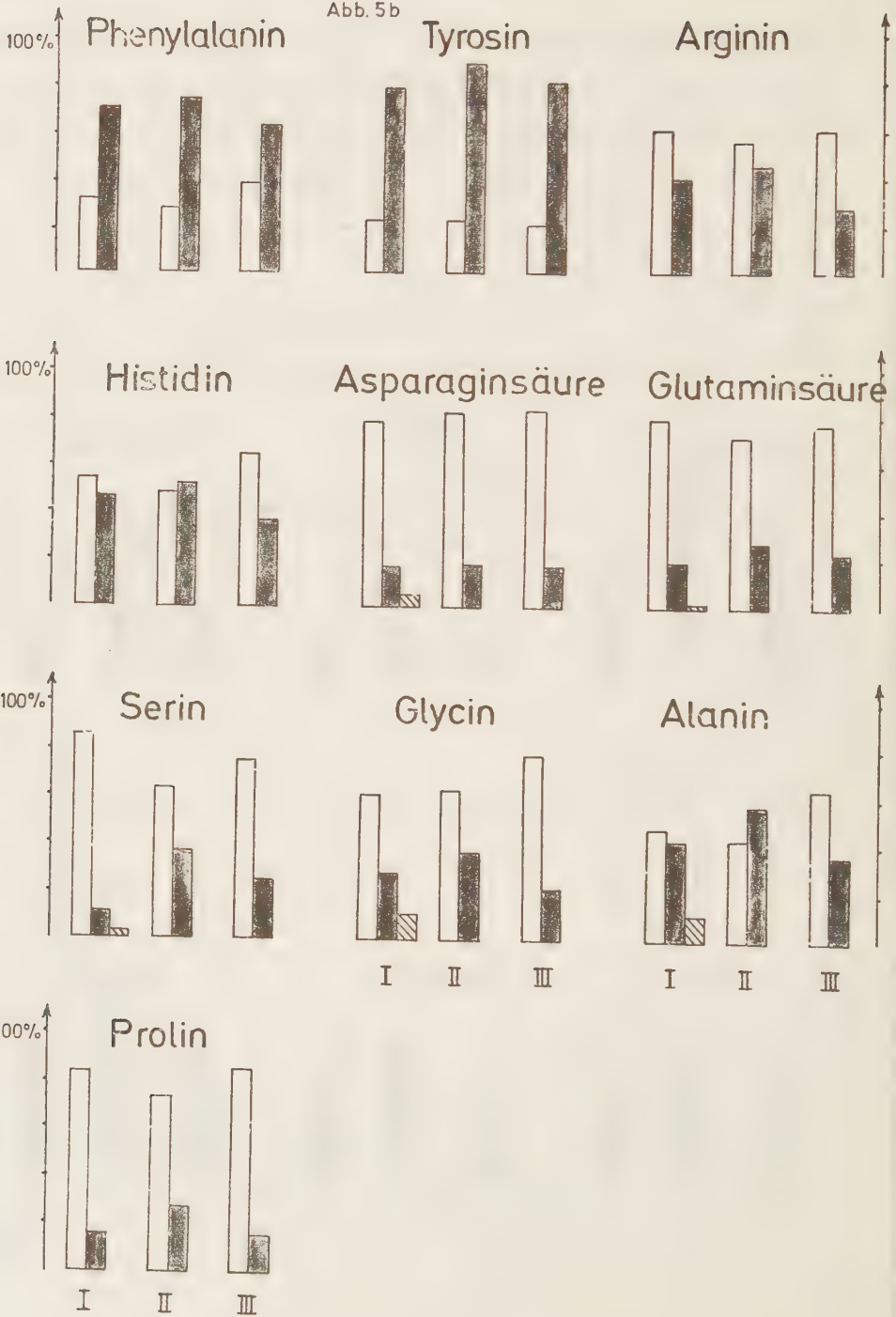


Abb. 5b



4. Diskussion und Schlußfolgerungen

4.1 Untersuchungsmethoden

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollte festgestellt werden, inwieweit sich analytische Verfahren, basierend auf der enzymatischen Teilhydrolyse von Proteinen, zum Nachweis der Aminosäurenverfügbarkeit eignen. Dazu wurden an verschiedenen hitzebehandelten Proteinen "Verdauungsversuche" mit den Proteasen Pepsin, Pronase und Pepsin plus Papain durchgeführt. Als Kriterium für die Aktivität der Enzyme bzw. die "Verdaulichkeit" der Substrate wurden die enzymatische Lösbarkeit des Rohproteinanteils und ganz besonders die Freisetzung nicht fällbarer Moleküle (angegeben als Aminosäuren nach Schlußhydrolyse mit Salzsäure) herangezogen. Nach Ergebnissen von FORD und SALTER (26, 27) mit Pepsin plus Pankreatin plus Erepsin bzw. Pronase oder mit Pepsin plus Papain an Fischmehlen unterschiedlicher Qualität war zu erwarten, daß zumindest die Enzyme Pepsin plus Papain bzw. Pronase brauchbare Resultate bringen würden.

Auf der anderen Seite ist die Verdauung ein so komplexer Vorgang, daß eine Nachahmung *in vitro* immer einen unvollkommenen Versuch darstellen wird. Im Folgenden werden die wesentlichen Punkte, in denen sich die enzymatische Hydrolyse des *in vitro* Tests vom biologischen Verdauungsvorgang unterscheidet, dargestellt.

Bei der "Verdauung" *in vitro* kommt es zu einer Akkumulation von Hydrolysenprodukten, die *in vivo* sofort resorbiert werden würden. Diese Spaltprodukte beeinträchtigen die nachfolgenden Verdauungsreaktionen um so stärker, je länger der Vorgang andauert. MAURON et al. (50, 51) und auch STEINHARDT (77) entwickelten deshalb *in vitro* Verfahren, bei dem gleichzeitig das Testprotein enzymatisch hydrolysiert und die Spaltprodukte durch Dialyse entfernt wurden. PRAHL und TÄUFEL (68) verwendeten sogar mehrere Dialysierapparate hintereinander. FORD und SALTER (27) versuchten, die Hydrolyseprodukte aus dem System zu entfernen, indem sie das Enzym-Substrat-Gemisch eine Säule mit Sephadex-Gel G-10 (untere Trenngrenze beim Molekulargewicht 700) passieren ließen. Die Hydrolyse fand in der Säule

zifität besitzen wie z. B. die Pronase. Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen (s. Tab. 5) hat nun tatsächlich gezeigt, daß mit Pronase schon eine recht weitgehende Hydrolyse der nicht geschädigten Proteine erreicht werden konnte. Bei der "Verdauung" mit Pepsin plus Papain war das Ausmaß der Hydrolyse nicht ganz so hoch, immerhin aber noch zufriedenstellend. Bei der Unterteilung der Spaltprodukte in Molekulargewichtsböcke zeigte es sich allerdings, daß nach der Hydrolyse mit Pepsin plus Papain nur geringe Mengen an kleineren Peptidbruchstücken aufgetreten waren. Leider war es uns aus technischen Gründen nicht möglich (Fehlen eines geeigneten Fraktionssammlers), die Sephadextrennung mit den durch Pronase hydrolysierten Vergleichsproteinen zu wiederholen.

Die nach der enzymatischen Hydrolyse erhaltenen Fraktionen der Aminosäuren und Oligopeptide sind schlecht voneinander zu trennen. Für die saubere Identifizierung als freigesetzte Aminosäuren müssen jedoch diese Peptide einer abschließenden Säurehydrolyse unterzogen werden. Hierbei können Peptide, die für den Organismus nicht mehr resorbierbar oder verwertbar sind, gespalten werden. Damit werden sie nicht als unverfügbare Bestandteile erkannt. Über die chemische Natur dieser enzymresistenten Bindungen ist bisher noch wenig bekannt. Lediglich die bei der Reaktion der ϵ -Aminogruppe des Lysins mit reduzierenden Zuckern entstehenden Lysin-Zucker-Komplexe sind inzwischen näher untersucht (20, 33, 34, 46). Dies trifft besonders für das ϵ -Fruktoselysin und das ϵ -Laktuloselysin (Galaktose-Fruktoselysin) zu, das durch ein während der salzsäuren Hydrolyse entstehendes Folgeprodukt, das Furosin, analytisch gut erfaßt werden kann. (14, 15, 20, 21, 22, 24). Dieses Furosin konnte tatsächlich auch im Hydrolysat der nicht fällbaren, löslichen Fraktion identifiziert werden (s. Tab. 4). Dies zeigt deutlich, daß auch diejenigen Abschnitte im hitzgeschädigten Protein, die den nachgewiesenermaßen ernährungsphysiologisch nicht verfügbaren Lysin-Zuckerkomplex enthalten, wenigstens teilweise in kleinere, nicht mehr fällbare Bruchstücke gespalten werden können.

Immerhin zeigen die im folgenden zu besprechenden Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen, daß es mit Hilfe der enzymatischen Verfahren möglich ist, Proteine unterschiedlicher Qualität zu beurteilen. Die Hydrolyse der Proteine mit Pepsin allein dürfte allerdings für die Bestimmung der enzymatisch freisetzbaren Peptide und Aminosäuren weniger geeignet sein. Wie sich bei den Untersuchungen über die Fehlerbreite der Analysenverfahren ergab (s. Tab. 4), waren sowohl das Pepsin + Papain-Verfahren als auch die Pronase-Methode gut reproduzierbar. Dies gilt besonders für das Verfahren mit Pronase, bei dem die Streuung in Prozent des Mittelwertes fast immer unter $\pm 5\%$ blieb.

4.2 Ergebnisse

Bei der enzymatischen Hydrolyse von Sojaprotein sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Intensität der Hitzebehandlung auf die enzymatische Freisetzung von Aminosäuren ausübt. Dabei zeigte sich, daß mit steigenden Erhitzungstemperaturen eine fortschreitende Abnahme der freigesetzten Aminosäuren auftrat, die bei Methionin und Lysin am deutlichsten wurde. Bei fast allen Aminosäuren waren "Verluste" spätestens bei der Erhitzungstemperatur von 138°C klar zu erkennen. Die Gehalte freigesetzter Aminosäuren lagen bei den auf 160°C erhitzten Proben nur noch bei 20 % und weniger der Vergleichswerte (auf 95°C erhitztes Sojaprotein). Wenn man die Abweichung der Einzelwerte (mit Fett, ohne Fett) als Fehlerbreite zugrundelegt, dann sind allerdings die Unterschiede für die meisten Aminosäuren nur beim auf 160°C erhitzten Protein gesichert. Lediglich bei einigen Aminosäuren ist es schon früher (bei 138°C bzw. schon bei 125°C) zu einem deutlichen Abfall gekommen. Dies trifft besonders für das Lysin und das Threonin zu. An hitzebehandelten Mischungen aus isoliertem Sojaprotein mit Sojaöl sollte außerdem untersucht werden, ob es durch die Anwesenheit des Fettes bei der Erhitzung zu einer verstärkten Aminosäureschädigung kommt. Hierbei konnten die Ergebnisse von WEBER (80), der am selben Material die Aminosäurenverfügbarkeit mittels der Pfortadertechnik ermittelte

und für die zusammen mit Öl erhitzten Proben eine geringere Proteinqualität gefunden hatte, nicht bestätigt werden. In den vorliegenden Untersuchungen lagen "Verdaulichkeitswerte" für die mit Öl bei 115°C und 125°C erhitzten Proben sogar höher als bei den ohne Öl erhitzten Proben. Das kann daran gelegen haben, daß bei der Vergleichsprobe (mit Öl auf 95°C erhitztes Sojaprotein) relativ niedrige Werte erhalten wurden. Möglicherweise hat der nicht extrahierbare Restfettgehalt in der schwach erhitzten Probe den Vorgang der enzymatischen Proteinhydrolyse ungünstiger beeinflusst, als dies bei den stärker hitzebehandelten Proben der Fall war.

Die Werte für das enzymatisch lösbare Rohprotein waren bei 138°C und 160°C ebenfalls deutlich erniedrigt. So wurden z. B. nach der Hydrolyse mit Pepsin plus Papain Werte von 67°C und 22 % - 14 % des Ausgangsgehaltes gefunden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten von GUNSSER (30) aus Verdauungsversuchen mit Ratten am selben Material gut überein.

Die vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, daß es mit zunehmenden Erhitzungstemperaturen durch Bildung enzymresistenter Bindungen zu einer Inaktivierung der Aminosäuren gekommen ist. Eine Aminosäurenzerstörung wäre bereits bei der chemischen Aminosäurenanalyse zu erkennen gewesen. Damit lassen sich aus dem Ergebnis der vorliegenden in vitro Tests dieselben Schlußfolgerungen ableiten wie aus den Tierversuchen von WEBER bzw. GUNSSER (Aminosäurenanflutung im Pfortaderplasma nach der Testmahlzeit der Proteine an Ratten sowie Verdaulichkeits- und Wachstumsversuche mit Ratten) (23), bei denen es zu Schädigungen ähnlicher Art gekommen war.

In zwei weiteren Versuchsreihen sollte ermittelt werden, ob eine Hitzebehandlung von Casein mit Glukose die in vitro "Verdaulichkeit" stärker beeinflusst als eine Erhitzung ohne reduzierende Zucker. Biologische Untersuchungen an den gleichen Proben hatten für die relative Aminosäurenverfügbarkeit (Pfortadertechnik) (19), für die Verdaulichkeit und das Wachstum sowie für die Biologische Wertigkeit (30) gezeigt, daß die Schädigung bei Erhitzung mit Glukose ausgeprägter war als bei Erhitzung ohne Glukose (21).

An Casein, autoklaviertem Casein und zusammen mit Glukose autoklaviertem Casein wurde versucht, die bei der enzymatischen Hydrolyse erhaltenen Spaltprodukte entsprechend ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Nach der Hydrolyse mit Pepsin plus Papain wurde deshalb eine Gelfiltration mit Sephadex G-25 durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß der "gut verdaute" Anteil (Fraktion 3) nur beim unerhitzten Casein nachweisbar war. Durch die enzymatische Hydrolyse wurde offensichtlich das Protein in den hitzebehandelten Proben nicht mehr zu kleineren Peptiden aufgespalten. Die hitzebehandelten Proben waren somit weniger angreifbar durch die Enzyme als das unerhitzte Casein. Wie in biologischen Versuchen ermittelt wurde, bewirkte die Autoklavierung des Caseins ohne Glukose bei 138°C kaum eine Schädigung. Die Verdaulichkeit im Versuch mit Ratten war sogar erhöht gewesen, was auf eine Verbesserung der Hydrolysierung durch Denaturierung schließen läßt. Auch in in-vitro Tests war bei vielen Aminosäuren eine bessere "Verdaulichkeit" zu beobachten, besonders bei Methionin, Valin, Leucin, Isoleucin und Alanin. Eventuell liegen diese Aminosäuren nahe dem Angriffspunkt des Enzyms.

Bei der mit Glukose erhitzten Probe war die schlecht "verdaute" Fraktion (Fraktion 1) in allen Fällen höher als bei den weniger geschädigten Caseinen. Dies gilt besonders für Methionin, Threonin, Valin, Isoleucin, Phenylalanin, Glycin und Alanin. Dementsprechend ist in den meisten Fällen die Fraktion 2, die die besser "verdauten" Anteile enthält, erniedrigt. Das traf allerdings nicht oder kaum für Tyrosin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Lysin zu. Wahrscheinlich liegt der Angriffspunkt des Enzyms nicht bei diesen Aminosäuren, so daß die Unterschiede bei diesem Versuch nicht deutlich wurden. Da Lysin aber als die hitzeempfindlichste Aminosäure gilt, besonders in Proteinen; denen Glukose zugesetzt wurde, kann dieses in vitro Verfahren nicht als günstig für die Beurteilung der Verfügbarkeit des Lysins herangezogen werden. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sich für diese Zwecke die Pronase besser eignet, oder ob man das Trypsin, dessen spezifischer Ort der Wirkung beim Lysin liegt, als weiteres Enzym für derartige Untersuchungen

heranziehen sollte. Die hohe "Verdaulichkeit" des Lysins in den mit Pronase behandelten unerhitzten Proteinen (s. Tab. 5, 7, 8) läßt jedoch erwarten, daß mit Pronase die Verfügbarkeit des Lysins gut nachgewiesen werden kann.

5. Zusammenfassung

An verschiedenen, hitzegeschädigten Proteinen wurden Untersuchungen zur enzymatischen Hydrolyse in vitro (sogenannte in vitro-Verdaulichkeit) durchgeführt. Als Testproteine dienten isoliertes Sojaprotein und Säurecasein bzw. unterschiedlich hitzebehandelte Chargen dieser beiden Ausgangsprodukte. Die enzymatische Hydrolyse wurde mit Pepsin-Salzsäure, mit Pronase (Protease aus *Streptomyces griseus*) sowie mit Pepsin plus Papain durchgeführt. Im enzymatisch aufgeschlossenen Material wurden der Gehalt an löslichem Rohprotein (Nx 6.25) sowie der Anteil an nicht ausfällbaren Aminosäuren und Peptiden (analytisch festgestellt als Aminosäuregehalt nach salzsaurer Schlußhydrolyse) bestimmt. In einer zusätzlichen Untersuchung wurden die nach Pepsin- + Papain-Hydrolyse erhaltenen Peptide und Proteinbruchstücke durch Gelfiltration in drei Gruppen mit je einem bestimmten Molekulargewichtsbereich eingeteilt. Die drei Molekulargewichtsruppen wurden anschließend auf ihren Aminosäuregehalt untersucht.

Das Ergebnis der Untersuchungen zeigt deutlich, daß mit zunehmender Hitzeschädigung des Proteins das Ausmaß der enzymatischen Hydrolyse geringer wird. Offensichtlich kommt es durch die Hitzebehandlung zur Bildung enzymresistenter Quervernetzungen, die das Angreifen der Protease erschweren oder gänzlich verhindern. Für den Nachweis dieser abgestuften Schädigungen war die Pronase als polyvalentes eiweißspaltendes Enzym am besten geeignet. Die Pepsin-Salzsäure-Methode eignet sich dagegen lediglich für die Feststellung des Pepsin-Salzsäure löslichen Rohproteins. Für den differenzierten Nachweis der Proteinverdaulichkeit und Aminosäurenverfügbarkeit war sie dagegen zu wenig spezifisch. Die Auftrennung der Proteinbruchstücke und Peptide in Molekulargewichtsböcke mit Hilfe der Gelfiltration (Sephadex G-25) gelang nur unvollkommen. Immerhin war deutlich zu erkennen, daß nach der enzymatischen Hydrolyse bei einem unerhitzten Casein mehr Spaltprodukte mit kleinerem Molekulargewicht erhalten wurden, als bei der "Verdauung" der stark hitzegeschädigten

Charge. Eine Isolierung bestimmter unverdaulicher, bei Hitzebehandlung auftretender Aminosäuregruppierungen gelang nicht.

Bei einem Vergleich der erhaltenen Befunde mit Ergebnissen biologischer Tests anderer Autoren (Wachstumsversuch, Anflutung freier Aminosäuren im Pfortaderblut nach einer Testmahlzeit, Aminosäurenverdaulichkeit) am selben Probenmaterial ergab sich eine recht gute Übereinstimmung in der Qualitätsabstufung bei den verschiedenen Produkten. Die Absolutwerte stimmten allerdings weniger gut überein. Hierbei zeigte es sich, daß als großer Nachteil des in vitro-Tests die Spaltung löslicher und möglicherweise schon recht kleiner, aber immer noch ernährungsphysiologisch nicht verwertbarer Peptide durch die notwendige Schlußhydrolyse angesehen werden muß. Immerhin ließ sich mit dem enzymatischen Verfahren die unterschiedliche Proteinqualität der Modellproteine besser erkennen als durch die einfache Aminosäurenanalyse nach salzsaurer Hydrolyse.

Summary

Examinations were carried out of numerous heat damaged proteins for the purpose of enzymatic hydrolysis in-vitro (in-vitro digestibility). Isolated sojaprotein and casein unheated as well as heat-treated under different conditions were used as test-proteins. The enzymatic hydrolysis was achieved with pepsin in hydrochloric acid, with pronase (protease from streptomyces griseus) and with pepsin and papain. After digestion the soluble proteins content was evaluated. Furthermore, the unprecipitable fraction, containing the amino acids and the peptides, was analyzed (both analytically determined in form of the amino acid content following final hydrolysis with hydrochloric acid). In an additional test, the obtained peptide and protein fractions, after pepsin and papain hydrolysis, were arranged by means of gelfiltration in three groups, each having a certain molecular weight.

The results of the study show clearly, that, with the increasing heat damage of the protein, the degree of enzymatic hydrolysis decreased. Presumably, enzyme-resistant cross linkages arise as a result of the heat treatment, which complicate or totally prevent the attack of the protease. As proof of this graduated damage, the digestion with pronase, a polyvalent proteinsplitting enzyme, seemed to be most useful. The pepsin-hydrochloric acid method, however, is only suitable for the determination of pepsin-hydrochloric acid soluble proteins. On the other hand, it didn't seem specific enough for the differentiated determination of the protein digestibility and amino acid availability. The separation of protein fractions and peptides in molecular weight groupings by means of the gelfiltration (with Sephadex G-25) was only partially achieved. Nevertheless, it was obvious to recognize, that after the enzymatic hydrolysis of casein, which did not undergo heat treatment, a greater fraction with smaller molecules was obtained than by digestion of samples which were very much damaged by the heat-treatment. The isolation of certain undigestible amino-acid groups, which should appear as a result of the heat-treatment, was not attained.

When comparing the obtained findings to the results of biological tests in similar studies (growth experiment, the concentration of free amino-acids in the portal blood after a test meal, and amino acid digestibility) it was shown that the same test material gave a very satisfactory correlation in the quality gradation by the different samples. The absolute values, however, did not correspond as well. Thus, it seems to be the greatest disadvantage of these in-vitro tests that the necessary final hydrolysis with hydrochloric acid splits soluble and possibly small peptides, though they are not utilizable by the organism. Nevertheless, the different protein quality of the tested samples could be better recognized with the enzymatic process than by means of the simple amino acid analysis after the hydrolysis with hydrochloric acid.

6. Literaturverzeichnis

1. AKESON, W. R., STAHMANN, M. A.
A pepsin pancreatine digest index of protein
quality evaluation.
J. Nutr. 83, 257 (1964)
2. ANDREWS, P. Estimation of the molecular weights of prote-
ins by Sephadex-gel filtration.
Biochem. J. 91, 222 (1964)
3. ANSON, M. L. The estimation of pepsin, trypsin, papain
and cathepsin with hemaglobin.
J. Gen. Physiol. 22, 79 (1938)
4. BALLS, A. K., LINEWEAVER, H., THOMPSON, R. R.
Crystalline papain.
Science, 86, 379 (1937)
5. BALLS, A. K., LINEWEAVER, H.
Isolation and properties of crystalline papain.
J. Biol. Chem. 130, 669 (1939)
6. BERGMANN, M., ZERVAS, L.
Ber. 65, 1192 (1932)
zitiert aus Lit. Angabe 43
7. BERGMANN, M., FRUTON, J. S., FRAENKEL-CONRAT, H.
On proteolytic enzymes.
XIII. Synthetic substrates for chymotrypsin.
J. Biol. Chem. 118, 405 (1936)
8. BERGMANN, M., FRUTON, J. S., FRAENKEL-CONRAT, H.
On proteolytic enzymes.
XIV. On the general nature of the enzymatic
degradation of proteins.
J. Biol. Chem. 118, 781 (1936)
9. BERGMANN, M., FRUTON, M. S., FRAENKEL-CONRAT, H.
On proteolytic enzymes.
XV. Regarding the general nature of intra-
cellular proteolytic enzymes.
J. Biol. Chem. 110, 35 (1937)
10. BERSIN, T., LOGEMANN, W.
Über den Einfluß von Oxydations- und Reduk-
tionsmitteln auf die Aktivität von Papain.
Z. Physiol. Chem. 220, 209 (1933)

21. ERBERSDOBLER, H., DÜMMER, H., ZUCKER, H.
Untersuchungen zur analytischen und physiologischen Charakterisierung der Aminosäurenschädigung bei Hitzebehandlung von Nahrungs- und Futtermitteln.
2. Mitt. Der Einfluß der Aminosäurenverfügbarkeit auf die Anflutung freier Aminosäuren im Pfortaderplasma.
Z. Tierphysiol. Tierern. Futtermittelkde. 24, 136 (1968)
22. ERBERSDOBLER, H.
Zur Lysinschädigung bei Hitzebehandlung von Nahrungs- und Futtermitteln.
Chemie und Landwirtschaftl. Produktion, S. 215 (1970)
23. ERBERSDOBLER, H., WEBER, G., GUNSSER, I.
Untersuchungen zur analytischen und physiologischen Charakterisierung der Aminosäurenschädigung.
4. Mitt. Erhitzung von Proteinen allein.
Z. Tierphys. Tierern. Futtermittelkde. 29, 325 (1972)
24. ERBERSDOBLER, H.
Zur Schädigung des Lysins bei der Herstellung und Lagerung von Trockenmilch
Milchwiss. 25, 280 (1970)
25. FINKLE, B. J., SMITH, E. L.
Chrystalline papain: Number and reactivity of thiol groups; chromatographic behavior
J. Biol. Chem. 230, 669 (1958)
26. FORD, J. E.
A microbiological method for assessing the nutritional value of proteins.
4. Analysis of enzymically digest food by Sephadex-gel filtration.
Brit. J. Nutr. 19, 277 (1965)
27. FORD, J. E., SALTER, D. N.
Analysis of enzymically digest food proteins by Sephadex-gel filtration.
Brit. J. Nutr. 20, 843 (1966)
28. FRANKEL, E. M. Studies on enzyme action.
XV. Factors influencing the proteolytic activity of papain.
J. Biol. Chem. 31, 201 (1917)
29. GREENBERG, D. M., WINNICK, T.
Plant proteases.
I. Activation-inhibition reactions.
J. Biol. Chem. 135, 761 (1940)

30. GUNSSER, I. Untersuchungen über den Einfluß einer Erhitzung von Proteinen auf die Aminosäuren-verdaulichkeit und biologische Wertigkeit. Med. vet. Diss. München 1972
31. HANKES, L. V., RIESEN, W. H., HENDERSON, L. M., ELVEHJEM, L. A. Liberation of amino acids from raw and heated casein by acid and enzyme hydrolysis. J. Biol. Chem. 176, 467 (1948)
32. HERRIOT, R. M. Isolation, crystallization, and properties of swine pepsinogen. J. Gen. Physiol. 21, 501 (1938)
33. HEYNS, K. NOACK, H. Die Umsetzung von D-Fructose mit L-Lysin und deren Beziehung zu nichtessentiellen Bräunungsreaktionen. Chem. Ber. 95, 720 (1962)
34. HEYNS, K., NOACK, H. Die Umsetzung von L-Tryptophan und L-Histidin mit Hexosen. Chem. Ber. 97, 415 (1964)
35. HILL, R. L. Hydrolysis of proteins. Advan. Protein. Chem. 20, 37 (1965)
36. HOOVER, S. R., KOKES, E. L. C. Effect of pH upon proteolysis by papain. J. Biol. Chem. 167, 199 (1947)
37. HWANG, K., IVY, A. C. A review of the literature on the potential therapeutic significance of papain. Ann. N. Y. Acad. Sci. 54, 161 (1951)
38. IRVING, Jr., G. W., FONTAINE, T. D. Purification and properties of arachain, a newly discovered proteolytic enzyme of the peanut. Arch. Bioch. Biophys. 6, 351 (1945)
39. JAFFE, W. G. Hurain, a new plant protease from Hura crepitans. J. Biol. Chem. 149, 1 (1943)
40. KIMMEL, J. R., SMITH, E. L. Properties of crystalline papain. Fed. Proc. 13, 241 (1954)
41. KIMMEL, J. R., SMITH, E. L. Crystalline Papain. I. Preparation, specificity, and activation. J. Biol. Chem. 207, 515 (1954)

42. KIMMEL, J. R., SMITH, E. L.
The properties of papain.
Adv. Enzym. 19, 267 (1957)
43. KREBS, H. A. Versuche über die proteolytische Wirkung
des Papains.
Biochem. Z. 220, 289 (1930)
44. KREBS, H. A. Über die proteolytische Wirkung von Papain
und Kathepsin.
Naturw. 19, 133 (1931)
45. LANGLEY, J. N. Pepsinogen and pepsin.
J. Physiol. (London) 3, 246 (1882)
46. LEA, C. H., HANNAN, R. S.
Studies of the reaction between proteins and
reducin sugars in the dry state.
III. Nature of the protein groups reacting.
Biochem. Biophys. Acta 5, 433 (1950)
47. LEE, D., RYLE, A. P.
Pepsinogen D.A fourth proteolytic zymogen
from pig gastric mucosa.
Bioch. J. 104, 735 (1967)
48. MARKLAND, Jr., F. S., SMITH, E. L.
Subtilisins: Primary structure, chemical
and physical properties. In "The Enzymes"
by Boyer, P. D., Vol. III, p. 561,
Academic Press New York and London (1971)
49. MATSUBARA, H., FEDER, J.
Other bacterial, mold, and yeast proteases.
In "The Enzymes" by Boyer, P. D., Vol. III,
p. 721 Acad. Press New York and London (1971)
50. MAURON, J., MOTTU, F., BUJARD, E., EGLI, R. H.
The availability of lysine, methionine, and
tryptophan in condensed milk and milk powder.
In vitro digestion studies.
Arch. Bioch. Biophys. 59, (2), 433 (1955)
51. MAURON, J., MOTTU, F.
Relationship between in vitro lysine avail-
ability and in vivo protein evaluation in
milk powders.
Arch. Bioch. Biophys. 77, 312 (1958)
52. MELNICK, D., OSER, B. L.
The influence of heat-processing on the
functional and nutritive properties of protein.
Food. Techn. 3, 57 (1949)

53. MENDEN, E., CREMER, H. D.

Über nichtenzymatische Bräunungsreaktionen
und ihre physiologischen Folgen.
2. Mitt. Methoden zur Erfassung von Verände-
rungen.
Z. Lebensm. Untersuchung u. -Forschung, 104,
105 (1956)

54. MENDEN, E., CREMER, H. D.

A laboratory method for the evaluation of
changes in protein quality.
Nutr. Dieta 8, 188 (1966)

55. MITCHELL, W. M., HARRINGTON, W. F.

"Clostripain". In "The Enzymes" by Boyer,
P. D.,
Vol. III, p. 699, Acad. Press New York and
London (1971)

56. NOLAN, C., SMITH, E. L.

Absence of sialic acids and other carbohy-
drates in crystalline papain.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 105, 287 (1960)

57. NEUMANN, H., LEVIN, Y., BERGER, A., KATCHATSKI, E.

Pepsin-catalysed transpeptidation of the
amino-transfer type
Bioch. J. 73, 33 (1959)

58. NOMOTO, M., NARAHASHI, Y.

A proteolytic enzyme of Streptomyces griseus
I. Purification of a protease of Str. griseus
J. Biochem. 46, 653 (1959)

59. NOMOTO, M., NARAHASHI, Y.

A proteolytic enzyme of Streptomyces griseus
II. An improved method for purification of a
protease of Str. griseus
J. Biochem. 46, 841 (1959)

60. NOMOTO, M., NARAHASHI, Y.

A proteolytic enzyme of Streptomyces griseus
III. Homogeneity of the purified enzyme
preparation
J. Biochem. 46, 1481 (1959)

61. NOMOTO, M., NARAHASHI, Y.

A proteolytic enzyme of Streptomyces griseus
IV. General properties of Str. griseus protease.
J. Biochem. 46, 1645 (1959)

62. NOMOTO, M., NARAHASHI, Y., MURAKAMI, M.
A proteolytic enzyme of *Streptomyces griseus*
VI. Hydrolysis of protein by *Str. griseus*
protease.
J. Biochem. 48, 593 (1960)
63. NOMOTO, M., NARAHASHI, Y., MURAKAMI, M.
A proteolytic enzyme of *Streptomyces griseus*.
VII. Substrate specificity of *Str. griseus*
protease.
J. Biochem. 48, 906 (1960)
64. NORTHROP, J. H. Crystalline pepsin.
I. Isolation and tests of purity.
J. Gen. Physiol. 13, 739 (1930)
65. NORTHROP, J. H., KUNITZ, M., HERRIOTT, R. M.
"Crystalline Enzymes", 2nd ed. Columbia Univ.
Press, New York (1948)
66. OSER, B. L. in "Protein and Amino Acid Nutrition" by
Albanes, A. A., ed. p. 281, Academic Press,
New York (1959)
67. PETRY, H. P. Untersuchungen zur Methodik der automatischen
Aminosäurenbestimmung am biologischen Material
(studiert an der Aminosäurezusammensetzung
der Pansenpopulation von Rindern).
Med. vet. Diss., München (1967)
68. PRAHL, L., TÄUFEL, K.
Über die Eiweiß-Verdauung in vitro bei
gleichzeitiger Dialyse.
Die Nahrung, 10, 31 (1966)
69. RAJAGOPALAN, T. G., MOORE, S., STEIN, W. H.
Pepsin from Pepsinogen.
Preparation and properties.
J. Biol. Chem. 241, 4940 (1966)
70. RYLE, A. P., PORTER, R. R.
Parapepsins: Two proteolytic enzymes asso-
ciated with porcine pepsin.
Biochem. J. 73, 75 (1959)
71. SANGER, F., THOMPSON, E. O. P., KITAI, R.
The amide groups of insulin.
Biochem. J. 59, 509 (1955)
72. SCHWANN, T. Über das Wesen des Verdauungsprocesses.
Arch. Anat. Physiol. p. 90 (1836)

73. SEIFTER, S., HARPER, E.
"The Collagenases". In "The Enzymes" by
Boyer, P. D., Vol. III, p. 649, Acad. Press
New York and London (1971)
74. SHEFFNER, A. L., ECKFELDT, G. A., SPECTOR, H.
The pepsin-di gest-residue (PDR) amino acid
index of net protein utilization.
J.Nutr. 60, 105 (1956)
75. SMITH, E. L., KIMMEL, J. R.
"The Enzymes"
2nd ed., Vol.IV, p. 133 (1960)
76. SPACKMAN, D. H., STEIN, W. H., MOORE, S.
An automatic recording apparatus for use in
the chromatography of amino acids.
Analyt. Chem. 30, 1190 (1958)
77. STEINHARDT, J. Zur in vitro Verdauung von Proteinen mit
Pepsin.
Rer. nat. Diss. München 1972
78. TANG, J. Specificity of pepsin and its dependence on
a possible "hydrophobic binding site".
Nature, 199, 1094 (1963)
79. TEH-YUNG, L., ELLIOT, S. D.
"Streptococcal Proteinase". In "The Enzymes"
by Boyer, P. D., Vol. III, p. 609, Acad. Press
New York and London (1971)
80. WEBER, G. Untersuchungen zur Aminosäurenverfügbarkeit
bei hitzegeschädigten Proteinen.
II. Erhitzung von Proteinen allein und mit
Fetten.
Med. vet. Diss. München 1972
81. WILLSTÄTTER, R., GRASSMANN, W.
Über die Aktivierung des Papains durch Blau-
säure.
Erste Abhandlung über pflanzliche Proteasen.
Z. Physiol. Chemie, 138, 184 (1924)
82. WILLSTÄTTER, R., GRASSMANN, W., AMBROS, O.
Substrat und Aktivitätsoptimum bei einigen
proteolytischen Reaktionen.
Dritte Abhandlung über pflanzliche Proteasen.
Z.Physiol. Chem. 151, 307 (1926)
83. WURTZ, A., BOUCHUT, E.
Sur le ferment digestif du Carica papaya.
Compt. rend. 89, 425 (1879)

84. WURTZ, A. Sur la papaine. Contribution à l'histoire des ferments solubles.
Compt. rend. 90, 1379 (1880)
85. WURTZ, A. Sur la papaine. Nouvelle contribution à l'histoire des ferments solubles.
Compt. rend. 91, 787 (1880)
86. VAN VANAKIS, H., HERRIOT, R. M.
Structural changes associated with the conversion of pepsinogen to pepsin.
I. The N-terminal amino acid residue and amino acid composition of the pepsin inhibitor.
Bioch. Biophys. Acta 22, 537 (1956)
87. VINES, S. H. The proteolytic enzyme of *Nepenthes* (III).
Ann. Botany 15, 563 (1901)
88. VINES, S. H. Tryptophane in proteolysis.
Ann. Botany 16, 1 (1902)
89. VINES, S. H. Proteolytic enzymes in plants (II)
Ann. Botany 17, 597 (1903)
90. VINES, S. H. The proteases of plants (II)
Ann. Botany 19, 149 (1905)

Lebenslauf

Name	Dore Ozdy geb. Häussler
geboren	am 21. April 1945 in Hamburg
Eltern	Dr. med. habil. Georg Häussler und seine Ehefrau Isabella geb. von Vegesack
Volksschule	1951 - 1955 in Hamburg
Höhere Schule	1955 - 1966 Heilwigsschule in Hamburg 1966 Abitur
Hochschule	1966 - 1971 Studium der Tiermedizin an der Universität München 1971 Staatsexamen 1971 Bestallung als Tierarzt
verheiratet	seit 1971 mit dem Tierarzt Andrew Ozdy

Nach Beendigung meiner Arbeit möchte ich Herrn Prof. DDR. DDR. h.c. Johannes Brüggemann für die Überlassung des Themas sowie für die großzügigen Arbeitsbedingungen in seinem Institut danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Universitätsdozent Dr. Helmut Erbersdobler für die mir jederzeit gewährte Förderung und Anregung sowie für die Durchsicht meiner Arbeit.

Die Arbeiten wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

